

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

16 May 2000 (16.05.00)

International application No.

PCT/JP99/05884

Applicant's or agent's file reference

121659-572

International filing date (day/month/year)

25 October 1999 (25.10.99)

Priority date (day/month/year)

23 October 1998 (23.10.98)

Applicant

NAKAMURA, Yuko et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

21 April 2000 (21.04.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Kiwa Mpay

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 121659-572	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05884	国際出願日 (日.月.年) 25.10.99	優先日 (日.月.年) 23.10.98
出願人(氏名又は名称) 明治製菓株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

酵素に関する請求項は次の発明群に分けられる。

- ・請求項 1-9 (60-85)
- ・請求項 10-28 (60-85)
- ・請求項 29-36 (60-85)
- ・請求項 37-39 (60-85)
- ・請求項 40-59 (60-85)

各発明群に係る酵素は「エンドグルカナーゼ活性」を有すること以外に共通する特徴を有していない。そして、エンドグルカナーゼ活性を有する酵素は周知であるので、各発明群に係る酵素が、特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるとは認められない。よって、各発明群は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 9/42, C12N 15/56, C11D 3/386, D06M 16/00, D21H 11/20

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 9/42, C12N 15/56, C11D 3/386, D06M 16/00, D21H 11/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO, 96/29397, A1 (NOVO-NORDISK AS) 26.9月.1996 (26.09.96) & EP, 815209, A1 & JP, 11-502701, A	1, 2, 60, 62 /3-59, 61, 63
A	Saloheimo Anu et al., "A novel, small endoglucanase gene, egI5, from Trichoderma reesei isolated by expression in yeast", Molecular Microbiology (1994), Vol. 13, No. 2, p. 219-228	1-85
A	WO, 97/43409, A2 (NOVO-NORDISK AS) 20.11月.1997 (20.11.97) & EP, 898618, A2	1-85

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.01.00

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一



4N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/12307, A1 (NOVO-NORDISK AS) 26. 3月. 1998 (26. 03. 98) & EP, 937138, A1	1 - 8 5

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 28 JAN 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 121659-572	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05884	国際出願日 (日.月.年) 25.10.99	優先日 (日.月.年) 23.10.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12N 9/42, C12N 15/56, C11D 3/386, D06M 16/00, D21H 11/20		
出願人 (氏名又は名称) 明治製菓株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☒ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 21.04.00	国際予備審査報告を作成した日 16.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 甲斐 順子 印	4 N 9641
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

☐ 請求の範囲を減縮した。

☒ 追加手数料を納付した。

☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。

☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2 ☐ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

☐ 満足する。

☐ 以下の理由により満足しない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

☒ すべての部分

☐ 請求の範囲 _____ に関する部分



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	3-59, 61, 63-85	有
	請求の範囲	1, 2, 60, 62	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	3-59, 61, 63-85	有
	請求の範囲	1, 2, 60, 62	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-85	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1, 2, 60及び62は、文献1 (W0, 96/29397, A) より新規性又は進歩性を有しない。

文献1には、種々のエンドグルカナーゼが記載されている。また該エンドグルカナーゼについて「セルロース繊維を含有する繊維材料の糸から突起する表面のフィブリルおよび繊維の除去」を測定したところ、結果が良好であったこと（実施例参照）が記載されている。

さらに、pH8.5における相対活性が至適pHの54%であるエンドグルカナーゼ、活性50%以上のpHが5.0-9.0やpH6.0-9.5のエンドグルカナーゼも記載されている。

（文献1のпатентファミリーである特表平11-502701号公報におけるp. 142-144、p. 148-155も参照のこと）

文献1には、「1mgタンパク質量/1以下の濃度で精製セルロース繊維の毛羽を完全に除去できる」とは、直接的に記載されていないが、(i) 上記実施例の記載からみて、文献1に記載されたエンドグルカナーゼも同様の毛羽除去活性を有していると認められること、(ii) 本願請求の範囲1及び2には、精製セルロース繊維の毛羽除去活性の試験方法等は記載されておらず、文献1に記載の酵素活性との間の差異は明らかでないこと、(iii) 本願請求の範囲1及び2の記載からは、文献1に記載の酵素との間の構造上の差異は認められないことからみて、文献1に記載の酵素と本願請求の範囲1及び2に記載の酵素との間に実質的な差異は認められない。

またある酵素をコードするポリヌクレオチドを取得すること、またヌクレオチド配列を設計する際に、宿主において高頻度使用されるコドンを選択することは、本願出願前当業者にとって周知の技術と認められる。

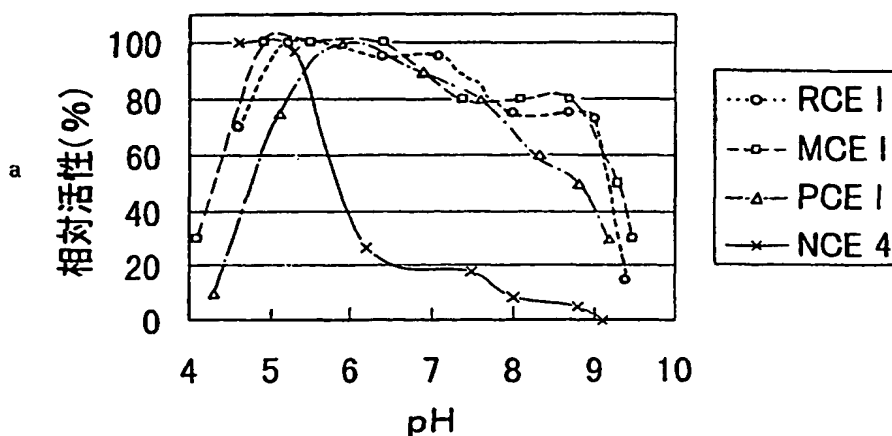




(51) 国際特許分類7 C12N 9/42, 15/56, C11D 3/386, D06M 16/00, D21H 11/20		A1	(11) 国際公開番号 WO00/24879
			(43) 国際公開日 2000年5月4日(04.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05884		(22) 国際出願日 1999年10月25日(25.10.99)	
(30) 優先権データ 特願平10/302387 1998年10月23日(23.10.98)		JP	(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社(MEIJ SEIKA KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 中村裕子(NAKAMURA, Yuko)(JP/JP) 馬場裕子(BABA, Yuko)(JP/JP) 西村智子(NISHIMURA, Tomoko)(JP/JP) 村島弘一郎(MURASHIMA, Kouichirou)(JP/JP) 中根公隆(NAKANE, Akitaka)(JP/JP) 古賀仁一郎(KOGA, Jinichiro)(JP/JP) 河野敏明(KONO, Toshiaki)(JP/JP) 〒350-0289 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama, (JP) 矢口貴志(YAGUCHI, Takashi)(JP/JP) 〒222-8567 神奈川県横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会社 薬品総合研究所内 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒100-0001 東京都港区虎の門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)	
		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
		添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: ENDOGLUCANASES AND CELLULASE PREPARATIONS CONTAINING THE SAME

(54)発明の名称 エンドグルカナナーゼ酵素およびそれを含んでなるセルラーゼ調製物



a ... RELATIVE ACTIVITY (%)

(57) Abstract

Enzymes having a high endoglucanase activity and showing a high activity under alkaline conditions and genes thereof. These enzymes have the following characteristics: a) showing an endoglucanase activity; and b) being capable of completely eliminating purified cellulose down at a concentration of 1 mg protein/l or less. The above enzymes having the endoglucanase activity involve proteins containing the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9 and 11, modifications of these proteins showing the endoglucanase activity and homologs thereof.

(57)要約

本発明は、高いエンドグルカナーゼ活性を有し、かつアルカリ条件下で高い活性を示す酵素およびその遺伝子の提供をその目的とする。本発明による酵素は、下記の特徴を有するものである： a) エンドグルカナーゼ活性を示す、 b) 1 mg タンパク質量 / 1 以下の濃度で精製セルロース繊維の毛羽を完全に除去できる。本発明によるエンドグルカナーゼ活性を有する酵素は、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、またはそれらの相同体である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LA	ラオス	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	NE	ニジェール	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国				
DK	デンマーク						

明 細 書

エンドグルカナーゼ酵素およびそれを含んでなるセルラーゼ調製物

発明の背景

発明の分野

本発明は、エンドグルカナーゼ酵素およびそれを含んでなるセルラーゼ調製物、並びにそのセルラーゼ調製物によるセルロース含有繊維、紙、パルプ、および畜産飼料の処理方法に関するものである。

背景技術

セルロース含有繊維を、その繊維に所望の特性を与えるためにセルラーゼで処理することが行われている。例えば、繊維業界においては、セルロース含有繊維の肌触りおよび外観を改善するために、あるいは着色されたセルロース含有繊維にその色の局所的な変化を提供する「ストーンウォッシュ」の外観を与えるために、セルラーゼによる処理が行われている（ヨーロッパ特許第307,564号）。

また、近年、木材パルプ由来のセルロースを有機溶媒に溶解し、紡糸する精製セルロース繊維であるリヨセルが、その高い強度、吸水度等の性質、さらには環境汚染を起こしにくいその製造法から、注目を集めてきた。しかし、リヨセルは製造工程中に毛羽が生じるために、そのままでは繊維としての商品価値は低いものとされている。そこで、製造工程中に生じる毛羽をセルラーゼにより除去する方法が提案されてきた。

ここでセルロース含有繊維とは、天然セルロース、例えば、木綿、麻や、再生セルロース、例えば、レーヨン、ポリノジック、キュプラ、そして精製セルロース、例えば、リヨセル、のようなセルロース系繊維素材から製造された繊維と、この繊維から製造された織物、編み物などの布帛、更にそれから縫製された衣料などをも含む。またさらに、セルロース系繊維素材と他の素材、例えば、合成繊維、羊毛、絹などをも含む繊維、布帛、縫製物も含まれる。

現在、セルロース含有繊維の処理には主に木材不朽菌であるトリコデルマ (Trichoderma) やフミコーラ (Humicola) 由来のセルラーゼが使用されている。これ

らセルラーゼは複数のセルラーゼ成分の混合物である。それらの実用化は、セルロース含有繊維に対して所望の効果を奏するには多量のセルラーゼ調製物を使用する必要から生じる困難性によって妨げられてきた。

上記のセルラーゼ調製物の短所は、多量のエンドグルカナーゼを含む調製物によって改善されつつある。例えば、エンドグルカナーゼ活性を増強したセルラーゼ調製物は、W089/09259号、W091/17243号、W098/03640号、およびW094/21801号で公表されている。特に、W091/17243号には、フミコーラ由来の精製された43kD エンドグルカナーゼ成分 (EGV) が、従来の複数のセルラーゼ成分の混合物であるセルラーゼ調製物の約100倍ものジーンズ脱色活性を有することが開示されている。また、W098/03640号には、フミコーラ由来のエンドグルカナーゼ成分であるNCE4が、従来の複数のセルラーゼ成分の混合物であるセルラーゼ調製物の25倍のジーンズ脱色活性、100倍ものリヨセル毛羽取り活性を有することが開示されている。しかしながら、精製セルロース繊維（例えば、リヨセル）に生じる強靱な毛羽を除去するために、工業的実用化レベルに見合うセルラーゼ調製物を提供するためには、更に高活性のエンドグルカナーゼ成分を含むセルラーゼ調製物が必要とされている。

一般に、セルロース含有繊維の繊維加工には精練、漂白、染色、シルケット加工等があり、いずれもアルカリ条件下で行われている。しかしながら、上記に示したエンドグルカナーゼを多量に含むセルラーゼ調製物にあっては、トリコデルマ由来のものは酸性領域に至適pHを有し、フミコーラ由来のものは中性領域に至適pHを有する。そのため、それらの使用の際には緩衝液の添加等によるpH調整を行い、上記繊維加工とは別工程で行う必要がある。

よって、アルカリ条件下で作用するエンドグルカナーゼ成分があれば、上記繊維加工と同一の工程で処理でき、工程の短縮化が可能となる。その結果、大幅なコストの低減化を可能なものとすることが考えられる。

一方、リゾプス (Rhizopus) 属由来のセルラーゼがアルカリ条件下において活性を保持し得ることが、特開昭60-226599号、特開昭64-40667号、特開昭64-26779号、特開平7-90300号において開示されている。これらの開示はいずれも衣類の洗濯すすぎに用いる洗浄剤の提供を目的として、リゾプス培養調製物を用いたも

のである。しかし、これらリゾプス培養調製物は活性が極めて低いために、とうてい実用化レベルに見合うものではない。

多くの場合、高活性なセルラーゼ調製物は、前述のように、多量なエンドグルカナーゼを含む調製物として提供される。そしてその製造方法としては、W091/17243号、W098/03667号、およびW098/111239号において公開されているように、遺伝子組換えの技術を用いて、目的のエンドグルカナーゼ成分を宿主細胞において大量に発現させる方法が知られている。そして、これらの方法において好ましい宿主細胞としては、不完全菌類に属する糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*)、フミコーラ (*Humicola*)、トリコデルマ (*Trichoderma*) 等が挙げられている。特に工業レベルでの酵素の生産を考慮した場合、不完全菌類に属するこれらの糸状菌は極めて優良な宿主となる。

しかしながら、異種由来の遺伝子を、これらの不完全菌類に属する糸状菌において発現させる際、その塩基配列上の特性が異なる（遺伝子のコドン使用頻度が違う）等の理由で、大量発現が妨げられる場合が多い。特に、接合菌類に属するリゾプス (*Rhizopus*) 属由来の遺伝子を、前述の不完全菌類に属する糸状菌において大量に発現させた例はなく、大量発現の技術が求められていたと言える。

このような背景のもと、近年、目的遺伝子を宿主細胞のコドン使用頻度に合わせて最適化することにより、宿主細胞内での大量発現を実現する技術が構築されつつある。宿主内において遺伝子を大量発現するために最適なコドン使用については、その天然の宿主細胞において比較的良好に発現している遺伝子のコドン使用を調査することによって推定される。このことは不完全菌類に属する糸状菌、アスペルギルス・ニージュランス (*Aspergillus nidulans*) のコドン使用頻度に関するLloydらの報告 (Andrew T. Lloyd and Paul M. Sharp, 1991. Mol. Gen. Genet. 230, 288-294) から明らかである。しかし、既存のDNA配列より、好適なコドン使用についての情報が得られたとしても、すぐにそれが目的遺伝子の大量発現につながるわけではない。特に制御が複雑な糸状菌においては、好適なコドン使用を有する配列から発現に最適な一つの配列を選択することが求められていた。

発明の概要

本発明者等は、今般、新規な高活性エンドグルカナーゼ酵素およびその遺伝子を接合菌であるリゾプス・オリゼー (*Rhizopus oryzae*)、ムコール・サーシネロイデス (*Mucor circinelloides*)、およびファイコマイセス・ニテンス (*Phycomyces nitens*) から単離した。そして、これらの酵素が精製セルロース繊維の毛羽除去処理において極めて強い活性を示し、しかも、アルカリ条件下においても強い活性を保持しているとの知見を得た。得られたエンドグルカナーゼ酵素は、今までにセルロース含有繊維の高い毛羽除去活性をもっているものとして知られているフミコーラ由来のEGV (W091/17243号) やNCE4 (W098/03640号) に比べて、中性領域において10～20倍、アルカリ性領域において20～50倍もの驚くべき強い活性を有している。

また、一般に低温、アルカリ性条件で作用させる洗剤組成物として利用した場合にも、綿の毛羽除去処理において強い活性を保持しているとの知見を得た。例えば、これら高活性エンドグルカナーゼは、洗剤用途として強い毛羽除去活性を示すものとして知られているフミコーラ由来のEGV (W091/17243号) やNCE4 (W098/03640号) に比べて、2～20倍もの強い活性を有している。

本発明者らは、さらに驚くべきことに、これらのエンドグルカナーゼ酵素のアミノ酸配列はそのセルロースバインディングドメイン (セルロース結合領域; cellulose-binding domain) 内の保存された共通配列であるグルタミン-システイン-グリシン-グリシンの次にリジン残基が存在するか、あるいは同じく共通配列であるアスパラギンの次にリジン残基が存在するという全く新規な特徴的な配列を有していることを見出した。

更にカタライティックドメイン (触媒領域; catalytic domain) のN末端側近傍のリンカー領域の一部分に精製セルロース繊維の毛羽除去に必要と思われる全く新規で特徴的な配列を見いだした。

本発明者らは、更に、そのセルロースバインディングドメインがN末端側にあるという糸状菌由来のファミリー45に属するエンドグルカナーゼとしては全く新しい構造を有しているということも見出した。

従って、本発明は、精製セルロースに対して非常に高いエンドグルカナーゼ活性を示し、かつアルカリ条件下で高い活性を示す酵素およびその遺伝子の提供を

その目的とする。

また、本発明は良好な特性を有するセルラーゼ調製物の提供をその目的としている。

さらに本発明は、上記酵素を用いたセルロース含有繊維、紙、パルプ、および畜産飼料の効率的で安価な処理法の提供をその目的としている。

そして、本発明による酵素は、下記の特性を有するものである。

- a) エンドグルカナーゼ活性を示す。
- b) 1mgタンパク質量/1以下の濃度で精製セルロース繊維の毛羽を完全に除去できる。

本発明の別の態様によるエンドグルカナーゼ活性を有する酵素は、配列番号1、3、5、7、9、または11に記載されるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、またはそれらの相同体である。

さらに、本発明によるエンドグルカナーゼ活性を有する酵素の遺伝子は、上記エンドグルカナーゼ活性を有する酵素をコードするヌクレオチド配列（例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、または13に記載のヌクレオチド配列）を含んでなるものである。

さらに、本発明によるセルラーゼ調製物は、上記のエンドグルカナーゼ活性を示す酵素を含んでなるものである。

さらにまた、本発明によるセルロース含有繊維等の処理法は、本発明によるエンドグルカナーゼ活性を示す酵素または本発明によるセルラーゼ調製物とセルロース含有繊維等とを接触させる工程を含んでなるものである。

図面の簡単な説明

図1は、エンドグルカナーゼRCE I、MCEI、PCEI、およびNCE4のリヨセル毛羽除去における反応pHと相対活性との関係を示すグラフである。

図2は、変異型エンドグルカナーゼRCE I、MCEI、およびNCE4のリヨセル毛羽除去における反応pHと相対活性との関係を示すグラフである。

図3は、RCE I遺伝子におけるコドンの使用頻度を示したコドン表である。

図4は、NCE I遺伝子におけるコドンの使用頻度を示したコドン表である。

図5は、NCE 2遺伝子におけるコドンの使用頻度を示したコドン表である。

図6は、NCE 4遺伝子におけるコドンの使用頻度を示したコドン表である。

発明の具体的説明

定義

本発明においてアミノ酸は3文字表記法に従って記載した。

本発明において「任意のアミノ酸残基」とは、Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、およびValを含む意味で用いられる。

本発明において「ヌクレオチド配列」とは、DNA配列のみならずRNA配列をも含む意味で用いられる。

微生物の寄託

リゾプス・オリゼー (Rhizopus oryzae) CP96001株は、FERM BP-6889の受託番号のもと、工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に1997年4月21日付けで寄託されている。

ムコール・サーシネロイデス (Mucor circinelloides) CP99001株は、FERM BP-6890の受託番号のもと、工業技術院生命工学工業技術研究所に1999年7月2日付けで寄託されている。

ファイコマイセス・ニテンス (Phycomyces nitens) CP99002株は、FERM BP-6891の受託番号のもと、工業技術院生命工学工業技術研究所に1999年7月2日付けで寄託されている。

エンドグルカナーゼ活性を示す酵素

本発明による酵素は、精製セルロース繊維、特にリヨセル等の毛羽除去加工において、従来知られている高活性エンドグルカナーゼに比べ、活性が高く、またアルカリ条件下においても作用する点で有利な性質を有する。本発明による酵素の高い活性は、精製セルロース繊維に所望の作用を提供するのに少量のセルラーゼ調製物が必要とされるにすぎない点で酵素の現実的な使用を可能にする。さらに、アルカリ条件下においても作用する性質は、現在不可能とされているアルカリ条件下での精製セルロース繊維の毛羽除去加工を可能にする。よって、本発明による酵素によれば、繊維加工の工程を短縮化し、コストの低減化を実用化でき

るものと考えられる。

リヨセルは精製セルロース繊維の一種として欧州化繊協会 (CIRFS) で正式に命名された名称であるが、一般製品ではアコーディス・ファイバース社の登録商標名として「テンセル」と呼ばれている。リヨセルは木材パルプ由来のセルロースを有機溶媒に溶解し、紡糸する繊維であるため、精製セルロース繊維と呼ばれているが、広義の意味では再生セルロース繊維に分類される。再生セルロース繊維に分類されるビスコース、レーヨン、ポリノジックなども精製セルロース繊維と同様に木材パルプ由来のセルロースから作られ、精製セルロース繊維と同じ結晶構造を有することから、本発明による酵素は再生セルロース繊維にも精製セルロース繊維に作用させた場合と同様な効果が得られる。

本発明の第一の態様によれば、前記 a) および b) の特性を有する酵素が提供される。

より詳細な酵素の性質は次の通りである。

① 作用および基質特異性

本発明による酵素は、エンドグルカナーゼ活性を示す酵素、すなわちエンド-1, 4- β -グルカナーゼ EC 3. 2. 1. 4 であり、具体的には β -1, 4-グルカンの β -1, 4-グルコピラノシル結合を加水分解するものである。基質としては精製セルロース繊維、例えば、リヨセル、に特異的に作用し、極めて低い濃度 (0. 2 ~ 1. 0 mg タンパク質量 / l) でテルセルの毛羽を完全に除去できる。

ここで「精製セルロース繊維の毛羽除去活性」とは、実施例 A 4 または A 5 に記載の方法により評価される活性をいう。

また「精製セルロース繊維の毛羽を完全に除去できる」とは、茶色に染色した後毛羽出し加工したニットリヨセル生地を酵素を用いることによって毛羽除去処理したときに、目視評価で全く毛羽が見えない状態を言う。具体的には、その毛羽除去処理した生地を分光測色計 (ミノルタ社製 CM-525i) を用い、実施例 A 6 の条件で $L^*a^*b^*$ 表色系の L^* 値 (明度) を測定したときに L^* 値が 24. 5 以下になるような生地の状態を言う。ここで、毛羽出し加工する前の茶色の生地とは分光測色計 (ミノルタ社製 CM-525i) によって L^* 値が 24 ~ 26 の範囲内

で、 a^* 値（色度）が4.7～5.1の範囲内で、 b^* 値（色度）が7.2～7.9の範囲内に入る色のものをいう。また、このリヨセル生地は糸番手40/1、ゲージ30" * 24 Gで紡いだニットスムーズを用い、スミフィックス（住友化学株式会社製）を用いて上記記載の茶色に反応染色させたものをいう。具体的なニットリヨセル生地の製品としてはOT7440ニットスムーズ（豊島株式会社製）が挙げられる。また、毛羽出し加工においては、この色の生地を使用した場合、 L^* 値が約30になるまで毛羽を出させる必要がある。

② 至適pHおよび安定pH

本発明によるエンドグルカナーゼをpH 8.5において精製セルロース繊維に作用させた場合の毛羽除去活性は、至適pHにおける毛羽除去活性の50%以上である。

リゾプス・オリゼー由来のエンドグルカナーゼは、CMCase活性での至適pHは約5であるが、pH 4～8において高い活性を有している。また、リヨセル毛羽除去活性での至適pHは約5であるが、pH 5～9において高い活性を有している。

ムコール・サーシネロイデス由来のエンドグルカナーゼは、CMCase活性での至適pHは約6であるが、pH 5～8において高い活性を有している。また、リヨセル毛羽除去活性での至適pHはpH 5～6であるが、pH 5～9において高い活性を有している。

ファイコマイセス・ニテンス由来のエンドグルカナーゼは、CMCase活性での至適pHは約6であるが、pH 5～8において高い活性を有している。また、リヨセル毛羽除去活性での至適pHは約6であるが、pH 5～8において高い活性を有している。

③ 至適温度および温度安定性

リゾプス・オリゼー由来のエンドグルカナーゼは、CMCase活性での至適温度は55～60℃であるが、45～65℃において高い活性を有している。また、リヨセル毛羽除去活性での至適温度は約55℃であるが、45～60℃において高い活性を有している。

ムコール・サーシネロイデスのエンドグルカナーゼは、CMCase活性で

の至適温度は45～55℃であるが、40～60℃において高い活性を有している。また、リヨセル毛羽除去活性での至適温度は約50℃であるが、約45～55℃において高い活性を有している。

ファイコマイセス・ニテンス由来のエンドグルナーゼは、CMCase活性での至適温度は45～55℃であるが、約40～60℃において高い活性を有している。また、リヨセル毛羽除去活性での至適温度は約50℃であるが、約45～55℃において高い活性を有している。

④ 分子量

SDS-PAGEにより測定した平均分子量は、リゾプス・オリゼー由来のものは約40 kDa、ムコール・サーシネロイデス由来のものは約41 kDa、ファイコマイセス・ニテンス由来のものは約45 kDaであることができる。

⑤ N末端配列

リゾプス・オリゼー由来のN末端配列は配列番号14のアミノ酸配列であることができる。ムコール・サーシネロイデス由来のN末端配列は配列番号15のアミノ酸配列であることができる。ファイコマイセス・ニテンス由来のN末端配列は配列番号16のアミノ酸配列であることができる。

⑥ セルロースバインディングドメイン

一般に、セルラーゼにはセルロースバインディングドメイン(CBD)がセルロースに結合する領域として存在することが知られている。さらに糸状菌由来のセルロースバインディングドメインには次のような共通配列が保存されていることが確かめられている(Hoffren, A.-M. et al., Protein Engineering 8:443-450, 1995)。

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Cys Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
1                                     10
Gly Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
                                     20
Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Cys Xaa (配列番号17)
30

```

(上記配列中、Xaaは任意のアミノ酸を示すが、20、21、22、23、24、

30、および31位のXaaは存在しなくてもよい。)

この配列において保存された共通配列であるGln-Cys-Gly-Glyの次にはIle、Gln、Ala、SerやAsnなどであるのが通例であるが、Lysである例はない。また、保存された共通配列であるAsnの次にはAsp、Pro、Gln、TyrやAlaなどであるのが通例であるが、やはりLysである例はない。本発明者らは、RCE I、II、IIIとPCEIのセルロースバインディングドメインにおいては、共通配列であるGln-Cys-Gly-Glyの次にはLysであり、MCEI、IIのセルロースバインディングドメインにおいては、共通配列であるAsnの次にはLysであるという全く新しいアミノ酸配列を見いだした。

本発明による酵素はアミノ酸配列 (I) からなるセルロースバインディングドメインを有することができる。

Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gln-Cys-Gly-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Asn-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln-Cys-Xaa (I) (配列番号18)

(上記配列中、Xaaはそれぞれ任意のアミノ酸残基を示すが、20、21、22、23、24、30、および31位のXaaはそれぞれ存在しなくてもよい。好ましくは24位のXaaは存在しない。11位および33位のXaaのいずれか一方はLysを表し、他方はLys以外のアミノ酸残基を表す。)

セルロースバインディングドメインは、好ましくは、アミノ酸配列 (II) からなることができる。

Cys-Ser-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln-Cys-Gly-Gly-Xaa-Xaa-Trp-Xaa-Gly-Pro-Thr-Cys-Cys-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Thr-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Asn-Xaa-Xaa-Tyr-Ser-Gln-Cys-Xaa (II) (配列番号19)

(上記配列中、Xaaはそれぞれ任意のアミノ酸残基を示すが、20、21、23、29、および30位のXaaはそれぞれ存在しなくてもよい。)

好ましくは、アミノ酸配列 (II) における11位および32位のXaaのいずれか一方はLysを表し、他方はLys以外のアミノ酸残基を表すことができる。

セルロースバインディングドメインは、更に好ましくは、アミノ酸配列 (III) からなることができる。

Cys-Ser-X1-X2-Tyr-X3-Gln-Cys-Gly-Gly-X4-X5-Trp-X6-Gly-Pro-Thr-Cys-Cys-X7-X8
-Gly-X9-Thr-Cys-X10-X11-X12-X13-X14-Asn-X15-X16-Tyr-Ser-Gln-Cys-X17 (III)

(配列番号 20)

(上記配列中、

X1は、Lys、Ser、またはGlnを表し、

X2は、Leu、Ala、Val、またはGlyを表し、

X3は、Gly、Tyr、またはSerを表し、

X4は、LysまたはIleを表し、

X5は、Asn、Asp、Gly、またはMetを表し、

X6は、Asn、Asp、Ser、またはThrを表し、

X7は、Glu、Asp、またはThrを表し、

X8は、SerまたはAlaを表し、

X9は、SerまたはPheを表し、

X10は、LysまたはValを表し、

X11は、Val、Asp、Ala、またはGlyを表し、

X12は、Ser、Tyr、Gln、またはAlaを表し、

X13は、Pro、Glu、またはLysを表すか、あるいは存在せず、

X14は、Asp、Gly、またはAsnを表すか、あるいは存在せず、

X15は、Asp、Pro、Lys、またはGluを表し、

X16は、Tyr、Phe、またはTrpを表し、

X17は、Leu、Val、またはIleを表し、

X4およびX15のいずれか一方がLysを表し、他方はLys以外のアミノ酸残基を表す。)

リゾプス属由来の本発明による酵素は、アミノ酸配列 (IV) からなるセルロースバインディングドメインを有することができる。

Cys-Ser-Lys-X21-Tyr-X22-Gln-Cys-Gly-Gly-Lys-X23-Trp-X24-Gly-Pro-Thr-Cys-Cys-Glu-Ser-Gly-Ser-Thr-Cys-X25-X26-X27-X28-X29-Asn-X30-X31-Tyr-Ser-Gln-Cys-X32

(IV) (配列番号 21)

(上記配列中、

X21は、LeuまたはAlaを表し、
X22は、GlyまたはTyrを表し、
X23は、AsnまたはAspを表し、
X24は、AsnまたはAspを表し、
X25は、LysまたはValを表し、
X26は、ValまたはAspを表し、
X27は、SerまたはTyrを表し、
X28は、Proを表すか、あるいは存在せず、
X29は、Aspを表すか、あるいは存在せず、
X30は、AspまたはProを表し、
X31は、TyrまたはPheを表し、
X32は、LeuまたはValを表す)

アミノ酸配列 (IV) のセルロースバインディングドメインは、好ましくは、配列番号 22、23、および24のいずれかのアミノ酸配列であることができる。

ムコール属由来の本発明による酵素は、アミノ酸配列 (V) からなるセルロースバインディングドメインを有することができる。

Cys-Ser-Ser-Val-Tyr-X41-Gln-Cys-Gly-Gly-Ile-Gly-Trp-X42-Gly-Pro-Thr-Cys-Cys-X43-X44-Gly-Ser-Thr-Cys-X45-Ala-Gln-X46-X47-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Cys-X48
(V) (配列番号 25)

(上記配列中、

X41は、GlyまたはSerを表し、
X42は、SerまたはThrを表し、
X43は、GluまたはAspを表し、
X44は、SerまたはAlaを表し、
X45は、ValまたはLysを表し、
X46は、GluまたはLysを表し、
X47は、GlyまたはAspを表し、
X48は、LeuまたはIleを表す。)

アミノ酸配列 (V) のセルロースバインディングドメインは、配列番号 26 ま

たは27のアミノ酸配列からなることができる。

ファイコマイセス属由来の本発明による酵素は、配列番号28のアミノ酸配列からなるセルロースバインディングドメインを有することができる。

⑦ リンカー領域およびカタライティックドメイン

エンドグルカナーゼにはカタライティックドメイン (catalytic domain : CAD) がセルロースを切断する領域として存在することが知られている。さらに、カタライティックドメインとセルロースバインディングドメインを架橋するアミノ酸領域はリンカー領域と呼ばれている。ファミリー45に属するエンドグルカナーゼにはカタライティックドメインの上流域に (SerまたはThrまたはAla) -Thr -Arg-Tyr- (TrpまたはTyrまたはPhe) -Asp-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa- (CysまたはAla) (配列番号29) という共通配列が保存されていることが確かめられている。本発明ではこの共通配列の上流域、すなわちリンカー領域の特定部分を欠失させることにより、リヨセル毛羽除去活性が失われることを見出し (実施例D9)、さらにその領域内に接合菌由来の6種のエンドグルカナーゼに共通な新規配列 (Tyr-Xaa-Xaa-Xaa-Ser-Gly-Gly-Xaa-Ser-Gly) (配列番号30) が存在することを発見した。

本発明による酵素はアミノ酸配列 (VI) からなるリンカー領域の一部を有することができる。

Tyr-Xaa-Xaa-Xaa-X51-Gly-Gly-Xaa-X52-Gly (VI) (配列番号31)

(上記配列中、Xaaはそれぞれ任意のアミノ酸残基を示し、X51およびX52はそれぞれSerまたはThrを表し、好ましくは、X51およびX52はSerを表す。)

リンカー領域の一部は、好ましくは、アミノ酸配列 (VII) からなることができる。

Tyr-X61-Xaa-X62-X51-Gly-Gly-Xaa-X52-Gly (VII) (配列番号32)

(上記配列中、

Xaaは任意のアミノ酸残基を表し、好ましくは、3位のXaaはAla、Ile、Pro、またはValを表し、8位のXaaはAla、Phe、またはLysを表し、

X51およびX52はそれぞれSerまたはThrを表し、好ましくは、X51およびX52はSerを表し、

X61はLysまたはSerを表し、

X62はIleまたはValを表す。)

リンカー領域の一部分は、更に好ましくは、配列番号33、34、35、36および37のいずれかに記載のアミノ酸配列からなることができる。

本発明による酵素は、N末端からC末端の方向において、セルロースバインディングドメイン、リンカー領域、およびカタライティックドメインを有することを特徴とする。

ここで、「リンカー領域の一部分」とはリンカー領域内に位置し、カタライティックドメインのN末端近傍に存在する領域を言う。具体的には、リンカー領域の一部分のC末端のアミノ酸残基は、カタライティックドメイン内に保存されている (SerまたはThrまたはAla) - Thr - Arg - Tyr - (TrpまたはTyrまたはPhe) - Asp - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - (CysまたはAla) (配列番号29) という共通配列中のAspから6～14アミノ酸残基、好ましくは、7～11アミノ酸残基、更に好ましくは9アミノ酸残基、上流に位置している。

⑧ 由来

本発明による酵素は、接合菌類、具体的には、リゾプス属 (例えば、リゾプス・オリゼー)、ムコール属 (例えば、ムコール・サーシネロイデス)、およびファイコマイセス属 (例えば、ファイコマイセス・ニテンシ)、の微生物から得ることができる。

本発明の別の態様によれば、アミノ酸配列 (I) ～ (V) のいずれかからなるセルロースバインディングドメインを含んでなり、かつエンドグルカナーゼ活性を示す酵素が提供される。

本発明の別の態様によれば、アミノ酸配列 (VI) または (VII) からなるリンカー領域の一部分を含んでなり、かつエンドグルカナーゼ活性を示す酵素が提供される。

本発明の別の態様によれば、アミノ酸配列 (I) ～ (V) のいずれかからなるセルロースバインディングドメインおよびアミノ酸配列 (VI) または (VII) からなるリンカー領域の一部分を含んでなり、かつエンドグルカナーゼ活性を示す酵素が提供される。

本発明の別の態様によれば、エンドグルカナーゼ活性を示す酵素として下記の特性を有するエンドグルカナーゼが提供される。

- i) ファミリー 45 に属する。
- ii) 糸状菌由来である。
- iii) セルロースバインディングドメインがN末端側に存在する。

「ファミリー 45 に属する」エンドグルカナーゼは、カタライティックドメイン内に (Ser または Thr または Ala) - Thr - Arg - Tyr - (Trp または Tyr または Phe) - Asp - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - (Cys または Ala) (配列番号 29) の共通配列を有するエンドグルカナーゼをいう (NiceSite view of PROSITE: PD0C00877 or PS01140, PROSITE Database of protein families and domains)。

「糸状菌由来のファミリー 45 に属する」エンドグルカナーゼとしては、今まで、EGV や NCE 4、*egl 5* (Saloheimo, A. *et al.*, Molecular Microbiology 13:219-228, 1994) 等が知られているが、これらは全てセルロースバインディングドメインがC末端側にある (Schulein, M., Biochemical Society Transactions 26:164-167, 1998)。しかしながら、本発明による接合菌由来の6種のエンドグルカナーゼはファミリー 45 に属し、セルロースバインディングドメインがN末端側にあるという全く新規な構造であった。

本発明における「ファミリー 45 に属する」エンドグルカナーゼとしては、具体的には、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列を含んでなるエンドグルカナーゼ活性を示す酵素、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、またはそれらの相同体であって、依然としてカタライティックドメイン内にある (Ser または Thr または Ala) - Thr - Arg - Tyr - (Trp または Tyr または Phe) - Asp - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - Xaa - (Cys または Ala) (配列番号 29) からなる共通配列が保持されているものが挙げられる。また、セルロースバインディングドメインおよび由来の例としては前記したものが挙げられる。

本発明の別の態様によれば、エンドグルカナーゼ活性を示す酵素として、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質が提供される。以下、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列を有するタンパク質を、それぞれエンドグルカナーゼ RCE 1、

RCE II、RCEIII、MCE I、MCE II、およびPCEIと呼ぶ。

本発明は、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのみならず、その改変タンパク質も包含するものである。本発明において、改変タンパク質とは、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列において、1 個または複数個（例えば、1 ～数十個、具体的には、1 ～約 50 個、好ましくは、1 ～約 30 個、更に好ましくは、1 ～約 9 個）のアミノ酸の付加、挿入、削減、欠失、または置換などの改変が生じたタンパク質を含んでなるタンパク質であって、依然としてエンドグルカナーゼ活性を保持するものを意味するものとする。

改変タンパク質としては、後述するように、アスパラギン結合型（Asn 型）糖鎖が付加しないように改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列が挙げられる。

改変タンパク質としては、セルロースバインディングドメインが改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載の改変アミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。改変タンパク質としては、セルロースバインディングドメインがアミノ酸配列（I）～（V）のいずれかを表すように改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載の改変アミノ酸配列（セルロースバインディングドメイン以外の領域が改変されていてもよい）からなるタンパク質が挙げられる。セルロースバインディングドメインにおける改変の数は、1 ～約 28 個、好ましくは、1 ～約 17 個、であることができる。

改変タンパク質としては、リンカー領域の一部分が改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載の改変アミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。改変タンパク質としては、また、リンカー領域の一部分がアミノ酸配列（VI）または（VII）を表すように改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載の改変アミノ酸配列（リンカー領域の一部分以外の領域が改変されていてもよい）からなるタンパク質が挙げられる。リンカー領域の一部分における改変は 1 ～約 6 個、好ましくは、1 ～約 4 個、であることができる。

改変タンパク質としては、セルロースバインディングドメインおよびリンカー領域の一部分が改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載の改

変アミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。改変タンパク質としては、また、セルロースバインディングドメインが配列（I）～（V）のいずれかを表すように改変され、かつリンカー領域の一部分が配列（VI）または（VII）を表すように改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載の改変アミノ酸配列（セルロースバインディングドメインおよびリンカー領域の一部分以外の領域が改変されていてもよい）からなるタンパク質が挙げられる。セルロースバインディングドメインにおける改変の数は、1～約 28 個、好ましくは、1～約 17 個、であることができる。リンカー領域の一部分における改変は 1～約 6 個、好ましくは、1～約 4 個、であることができる。

改変タンパク質としては、更にまた、セルロースバインディングドメイン（CBD）およびリンカー領域の一部分以外の領域が改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載のタンパク質が挙げられる。セルロースバインディングドメイン（CBD）およびリンカー領域の一部分以外の領域における改変の数は、1～約 30 個、好ましくは、1～約 15 個であることができる。このうちカタライティックドメインにおける改変の数は、1～約 20 個、好ましくは、1～約 10 個であることができる。

改変タンパク質としては、更にまた、セルロースバインディングドメイン（CBD）、リンカー領域の一部分、およびカタライティックドメイン（CAD）以外の領域が改変された配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載のタンパク質が挙げられる。セルロースバインディングドメイン（CBD）、リンカー領域の一部分、およびカタライティックドメイン（CAD）以外の領域の改変の数は、1～約 10 個、好ましくは 1～約 5 個、であることができる。

配列番号 1、3、5、7、9、および 11 の配列中のセルロースバインディングドメイン（CBD）、リンカー領域の一部分、およびカタライティックドメイン（CAD）の位置（アミノ酸残基番号）は下記の通りである。

	CBD	リンカー領域の一部分	CAD
配列番号 1	3～38	99～108	109～315
配列番号 3	3～38、50～85	127～136	137～343

配列番号 5	3 ~ 4 0	1 2 2 ~ 1 3 1	1 3 2 ~ 3 3 7
配列番号 7	3 ~ 4 0	1 0 4 ~ 1 1 3	1 1 4 ~ 3 1 6
配列番号 9	3 ~ 4 0、5 2 ~ 8 9	1 5 3 ~ 1 6 2	1 6 3 ~ 3 6 5
配列番号 1 1	3 ~ 4 0	1 1 5 ~ 1 2 4	1 2 5 ~ 3 2 7

さらに、本発明は、配列番号 1、3、5、7、9、または 1 1 に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびその改変タンパク質のみならず、その相同体をも包含するものである。本発明において、相同体とは、配列番号 1、3、5、7、9、または 1 1 に記載されるアミノ酸配列をコードする遺伝子（ヌクレオチド配列）と「限定された条件下でハイブリダイズする」遺伝子（ヌクレオチド配列）によりコードされるアミノ酸配列を有し、かつエンドグルカナーゼ活性を有するポリペプチドを意味する。ここで、「限定された条件下」とは、配列番号 1、3、5、7、9、または 1 1 に記載されるアミノ酸配列、またはその改変タンパク質のアミノ酸配列、の一部または全部の配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなるプローブと相同体をコードする遺伝子とがハイブリダイズする一方で、このプローブが、W098/03640号に記載のエンドグルカナーゼNCE4遺伝子およびW098/54332号に記載のエンドグルカナーゼSCE3遺伝子とはハイブリダイズしない程度に制御された条件を意味する（なお、ここで、DNA量は、NCE4遺伝子、SCE3遺伝子、相同体をコードする遺伝子とも同量使用することとする）。より具体的には、プローブとして標識化した配列番号 2 に記載のDNA配列の全長を有するものを用い、ECL ダイレクト DNA/RNA ラベリング検出システム（アマシャム社製）の方法に従って、1時間のプレハイブリダイゼーション（42℃）の後、前記プローブを添加し、15時間（42℃）ハイブリダイゼーションを行った後、0.4% SDS、6M 尿素添加0.5倍濃度SSC（SSC；15mM クエン酸三ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム）で42℃、20分間の洗浄を2回繰り返し、次に5倍濃度SSCで室温、10分間の洗浄を2回行うような条件が挙げられる。

本発明による酵素は、例えば、実施例A 1～3に記載のように微生物から単離・精製することにより得ることができる。

本発明による酵素は、また、後述のように遺伝子組み換え技術により本発明に

よる酵素をコードするヌクレオチド配列を適当な宿主において発現させ、生産されたタンパク質を単離・精製することによっても得ることができる。

本発明による酵素には、前記のセルロースバインディングドメインやリンカー領域の一部分と任意のカタライティックドメインとからなる組み換え酵素も含まれる。このような組み換え酵素は、例えば、Tomme, P. et al., J.Bacteriol.177:4356-4363,1995に記載される方法に従って製造できる。

エンドグルカナーゼ遺伝子

本発明によれば、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質、またはそれらの相同体をコードするヌクレオチド配列が提供される。タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする DNA 配列は容易に定まり、よって、配列番号 1、3、5、7、9、または 11 に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質、またはそれらの相同体をコードする種々のヌクレオチド配列を選択することができる。

本発明によるヌクレオチド配列は、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよく、また、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。本発明によるヌクレオチド配列の典型的な取得方法としては、ムコール・サーシネロイデスやファイコマイセス・ニテンス由来の染色体ライブラリーまたは cDNA ライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば、部分アミノ酸配列の情報を基にして作製した適当な DNA プローブを用いてスクリーニングを行う方法などが挙げられる。

以下、エンドグルカナーゼ RCE I、RCE II、RCE III、MCE I、MCE II、および PCEI 並びにそれらの遺伝子をさらに説明する。

(1) エンドグルカナーゼ RCE I およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ RCE I は、配列番号 1 に記載される 1～315 番のアミノ酸配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タンパク質の N 末端には、更に配列番号 1 の -23～-1 番までのアミノ酸配列またはその一部が付加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ RCE I の改変ペプチドの一種として本発明に包含されるものである。この -23～-1 番までのアミノ酸配列は、分泌のためのシグナルペプチドと考えられ

る。よってその一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果としてN末端に残る配列をも意味するものとする。

更に本発明によれば、配列番号1のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号2に記載されるヌクレオチド配列の一部または全部を有するものである。配列番号2に記載されるヌクレオチド配列は、1～3番のATGで始まり、1015～1017番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、70～72番のヌクレオチド配列は315残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

(2) エンドグルカナーゼ RCEII およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ RCEII は、配列番号3に記載される1～343番の配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タンパク質のN末端には、更に配列番号1の -23～-1番までのアミノ酸配列またはその一部が付加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ RCEII の改変ペプチドの一種として本発明に含まれるものである。この -23～-1番までのアミノ酸配列は、シグナルペプチドと考えられることから、その一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果としてN末端に残る配列をも意味するものとする。

更に、本発明によれば、配列番号3のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼ RCEII 遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号4に記載されるヌクレオチド配列の一部または全部を有するものである。配列番号4に記載されるヌクレオチド配列は、1～3番のATGで始まり、1099～1101番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、70～72番のヌクレオチド配列は343残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

(3) エンドグルカナーゼ RCEIII およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ RCEIII は、配列番号5に記載される1～337番の配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タンパク質のN末端には、更に配列番号1の -23～-1番までのアミノ酸配列またはその一部が付

加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ RCEIIIの改変ペプチドの一種として本発明に含まれるものである。この -23~-1番までのアミノ酸配列は、シグナルペプチドと考えられることから、その一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果としてN末端に残る配列をも意味するものとする。

更に本発明によれば、配列番号5のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼ RCEIII 遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号6に記載されるヌクレオチド配列の一部または全部を有するものである。配列番号6に記載されるヌクレオチド配列は、1~3番のATGで始まり、1081~1083番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、70~72番のヌクレオチド配列は337残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

(4) エンドグルカナーゼ MCE I およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ MCE I は、配列番号7に記載される1~316番のアミノ酸配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タンパク質のN末端には、更に配列番号7の -22~-1番までのアミノ酸配列またはその一部が付加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ MCE I の改変ペプチドの一種として本発明に包含されるものである。この -22~-1番までのアミノ酸配列は、分泌のためのシグナルペプチドと考えられる。よってその一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果としてN末端に残る配列をも意味するものとする。

更に本発明によれば、配列番号7のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼMCEI遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号8に記載されるヌクレオチド配列の一部または全部を有するものである。配列番号8に記載されるヌクレオチド配列は、1~3番のATGで始まり、1015~1017番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、67~69番のヌクレオチド配列は316残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

(5) エンドグルカナーゼ MCEII およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ MCEII は、配列番号 9 に記載される 1～365 番の配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タンパク質の N 末端には、更に配列番号 9 の -22～-1 番までのアミノ酸配列またはその一部が付加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ MCEII の改変ペプチドの一種として本発明に含まれるものである。この -22～-1 番までのアミノ酸配列は、シグナルペプチドと考えられることから、その一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果として N 末端に残る配列をも意味するものとする。

更に、本発明によれば、配列番号 9 のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼ MCEII 遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号 10 に記載されるヌクレオチド配列の一部または全部を有するものである。配列番号 10 に記載されるヌクレオチド配列は、1～3 番の ATG で始まり、1162～1164 番の TAA で終了するオープンリーディングフレームを有する。また、67～69 番のヌクレオチド配列は 365 残基からなる前記成熟タンパク質の N 末端アミノ酸に対応する。

(6) エンドグルカナーゼ PCEI およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ PCEI は、配列番号 11 に記載される 1～327 番の配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タンパク質の N 末端には、更に配列番号 11 の -19～-1 番までのアミノ酸配列またはその一部が付加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ PCEI の改変ペプチドの一種として本発明に含まれるものである。この -19～-1 番までのアミノ酸配列は、シグナルペプチドと考えられることから、その一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果として N 末端に残る配列をも意味するものとする。

更に本発明によれば、配列番号 11 のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼ PCEI 遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号 12 に記載されるヌクレオチド配列の一部または全部を有するものである。配列番号 12 に記載されるヌクレオチド配列は、1～3 番の ATG で始まり、1039～1041 番の TAA で終了す

るオープンリーディングフレームを有する。また、58～60番のヌクレオチド配列は327残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

発現ベクターおよび形質転換された微生物

本発明においては、配列番号1、3、5、7、9、または11に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質、またはそれらの相同体をコードするヌクレオチド配列を、宿主微生物内で複製可能で、かつ、そのDNA配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。本発現ベクターは、自己複製ベクター、即ち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、本発現ベクターは、宿主微生物に導入されたとき、その宿主微生物のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。本発明によるベクター構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望の活性を有するタンパク質を発現させるために、前記の本発明によるDNA配列の他に、その発現を制御するDNA配列や微生物を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいるのが望ましい。発現を制御するDNA配列としては、プロモーターおよびターミネーターおよびシグナルペプチドをコードするDNA配列等がこれに含まれる。プロモーターは宿主微生物において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種もしくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するDNA配列として得ることができる。また、シグナルペプチドは、宿主微生物において、タンパク質の分泌に寄与するものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種もしくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から誘導されるDNA配列より得ることができる。また、本発明における遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。

更に、本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、糸状菌などを用いた系、および、それらを用いた他のタンパク質との融合

タンパク質発現系などを用いることができる。

また、この発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。

更に、この形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から上記の本発明によるタンパク質を単離して得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造方法が提供される。形質転換体の培養およびその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同等であってよい。また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。

また、本発明における好ましい態様によれば、本発明によるDNA配列によってコードされるエンドグルカナーゼ酵素を発現させ得る酵母細胞が提供される。本発明における酵母細胞としては、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、またはピキア (*Pichia*) 属に属する微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

更に、本発明によれば、上記の本発明における発現ベクターにより得られた酵母形質転換体が産生するエンドグルカナーゼ酵素が、本発明における好適な用途に使用できる活性を示さなかった場合に、それを改善する方法が提供される。本発明における好適な用途に使用できる活性として、例えば、セルロース含有繊維の毛羽立ちの処理に有意に利用できる活性が挙げられる。

酵母細胞において異種タンパク質を発現させた場合、時として、過グリコシル化（過剰な糖鎖の付加）が起きることが Van Arsdell, J. N. ら (Van Arsdell, J. N., 1987, Bio Technology, 5, 60-64) によって報告されている。従って、このような酵母細胞において所望の活性を有するタンパク質を発現させる場合、糖鎖付加に対する制御が必要な場合が生じる。本発明においては、その一例として、アスパラギン結合型 (Asn型) 糖鎖認識部位を有するエンドグルカナーゼ酵素を、それをコードするDNA配列の改変により、Asn型糖鎖が付加しない変異型エンドグルカナーゼ酵素として上記酵母細胞にて発現する方法が提供される(実施例 B 9、C 6、C 10、E 4 参照)。

配列番号 1、3、5、7、9、および 11 に記載のエンドグルカナーゼ酵素の

Asn型糖鎖が付加しない変異型エンドグルカナーゼへの改変は、Asn型糖鎖認識部位Asn-Xaa-Ser/ThrにおけるAsn、Ser、および/またはThrの他のアミノ酸への置換、具体的には、AsnのAspまたはGlnへの置換、SerまたはThrのAla、Gly、またはLeuへの置換、あるいはXaaのProへの置換であることができる。

実施例C10およびC11に示されるように、セルロースバインディングドメインに近接する糖鎖認識部位を改変することにより酵素活性を大きく改善することができる。従って、Asn型糖鎖が付加しない変異型エンドグルカナーゼ酵素としては、下記のアミノ酸配列からなるものが挙げられる：

配列番号1の45番または47番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号1の改変アミノ酸配列、

配列番号3の45番または47番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号3の改変アミノ酸配列、

配列番号5の44番または46番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号5の改変アミノ酸配列、

配列番号7の50番または52番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号7の改変アミノ酸配列、

配列番号9の99番または101番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号9の改変アミノ酸配列。

Asn型糖鎖が付加しない変異型エンドグルカナーゼ酵素としては、また、下記のアミノ酸配列からなるものが挙げられる：

配列番号1の45番または47番のアミノ酸残基、および90番または92番のアミノ酸残基および/または130番または132番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号1の改変アミノ酸配列、

配列番号3の45番または47番のアミノ酸残基、および92番または94番のアミノ酸残基、119番または121番、122番または124番、および/または158番または160番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号3の改変アミノ酸配列、

配列番号5の44番または46番のアミノ酸残基、および49番または51番のアミノ酸残基、121番または123番および/または171番または173

番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号 5 の改変アミノ酸配列。

更に具体的には、Asn型糖鎖が付加しない変異型エンドグルカナーゼ酵素としては、下記のアミノ酸配列からなるものが挙げられる：

配列番号 1 の 4 7 番のSerがAlaに、9 2 番のSerがGlyに、1 3 0 番のAsnがAspに、それぞれ置換された配列番号 1 の改変アミノ酸配列、

配列番号 3 の 4 7 番のSerがAlaに、9 2 番のAsnがGlnに、1 2 1 番のSerがLeuに、1 2 2 番のAsnがAspに、1 5 8 番のAsnがAspに、それぞれ置換された配列番号 3 の改変アミノ酸配列、

配列番号 5 の 4 4 番のAsnがAspに、1 2 1 番のAsnがLysに、それぞれ置換された配列番号 5 の改変アミノ酸配列、

配列番号 7 の 5 2 番のSerがGlyに置換された配列番号 7 の改変アミノ酸配列、

配列番号 9 の 101 番のSerがGlyに置換された配列番号 9 の改変アミノ酸配列。

また、上記のように糖鎖付加を制御する場合、例えば、既存の変異処理技術を用いて、糖鎖付加能力を限定した（または、欠失した）宿主酵母細胞を用いることもできる。

本発明における上記エンドグルカナーゼ酵素の最も好適な製造方法として、不完全菌類に属する糸状菌における発現方法が提供される。不完全菌類に属する糸状菌において上記エンドグルカナーゼ酵素を発現させる場合、宿主糸状菌のコドン使用に合わせたコドン最適化遺伝子を用いることが望ましい。本発明においてコドン最適化遺伝子とは、あるタンパク質をコードするDNA配列を、宿主糸状菌において高頻度で使用されるコドンの情報をもとに置換し、得られるDNA配列を有する遺伝子を意味する。

また、本発明における最も好適なコドン最適化遺伝子として、イントロン認識配列を含まない（または、極力含まない）遺伝子が挙げられる。ここでのイントロン認識配列とは、不完全菌類に属する糸状菌においてイントロンと認識され得るDNA配列を意味する。より具体的には、GTAGN、GTATN、GTAAN、GTACGN、GTGTN、GCACGN、GTTCGN等のDNA配列を意味する。これらのDNA配列を含まないことは、目的遺伝子の転写産物であるmRNAの安定性の向上につながる。

さらに本発明においては、このコドン最適化遺伝子を全合成し、発現ベクター

に組み込んで宿主糸状菌を形質転換することにより、工業的に好ましい生産量を得ることができる。本発明における宿主糸状菌は、フミコーラ (Humicola) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属またはフザリウム (Fusarium) 属に属するものであることができる。さらにそれらの好ましい例としては、フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)、またはトリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride) が挙げられる。

また、本発明において用いられるコドン最適化遺伝子の一例として、コドン最適化エンドグルカナーゼRCE I 遺伝子が挙げられる。本遺伝子は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するエンドグルカナーゼRCE I をコードするコドン最適化遺伝子であり、その典型的配列は、配列番号 13 に記載されるヌクレオチド配列の一部または全部を有するものである。配列番号 13 に記載されるヌクレオチド配列は、16～18番のATGで始まり、1030～1032番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、85～87番のヌクレオチド配列は315残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

セルラーゼの用途／セルラーゼ調製物

本発明の別の態様によれば、上記の本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、または相同体を含んでなるセルラーゼ調製物が提供される。本発明によるセルラーゼ調製物は、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、または相同体を、セルラーゼ調製物に一般的に含まれる成分、例えば賦形剤（例えば、乳糖、塩化ナトリウム、ソルビトール等）、界面活性剤、防腐剤等とともに混合され製造されてよい。また、本発明におけるセルラーゼ調製物はいずれか適当な形状、例えば粉末または液体状、あるいは造粒による顆粒状、に調製することができる。

さらに本発明によれば、セルロース含有繊維の毛羽立ち始める速度を低減するか、毛羽立ちを低減するか、肌触りが悪くなる速度を低減するか、またはごわ付きを低減する方法が提供される。この方法は、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、またはセルラーゼ調製物によりセルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる。

更に本発明によれば、着色セルロース含有繊維の澄明化をもたらす方法であって、エンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で着色セルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる方法、ならびに、着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化をもたらす方法、すなわち、着色セルロース含有繊維にストーンウオッシュの外観を与える方法が提供される。そして、この方法は、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物により着色セルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる。

本発明による上記方法は、洗濯中にセルロース含有繊維を処理することにより実施できる。しかしながら、繊維の処理は、場合によって、ソーキングまたはすすぎ中に、繊維が浸漬されているかまたは浸漬されうる水に、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物を添加することによって実施されてもよい。

接触温度、エンドグルカナーゼ酵素の量などの条件は、他の種々の条件を勘案して適宜決定されてよいが、例えばセルロース含有繊維の毛羽立ち始める速度を低減するかまたは毛羽立ちを低減する場合、45～55℃程度の温度で、0.2～1 mg/lのタンパク濃度のエンドグルカナーゼ酵素を使用することにより処理することができる。

また、セルロース含有繊維の肌触りおよび外観の改善を目的とした減量加工の場合、45～55℃程度の温度で、5～100 mg/lのタンパク濃度のエンドグルカナーゼを使用することにより処理することができる。

更に、着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化をもたらす場合、45～55℃程度の温度で、2～10 mg/lのタンパク濃度のエンドグルカナーゼを使用することにより処理することができる。

また、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物を洗剤組成物中で用いることにより、粒質土壌除去、色彩明澄化、脱毛羽立ち、脱ピリングおよび手粗さ軽減に関し、それらを改善することができる。

本発明による洗剤組成物は、界面活性剤（アニオン性、ノニオン性、カチオン性、両性または双性イオン性あるいはそれらの混合物であり得る）をも含有し得る。更に、本発明による洗剤組成物は、当分野で既知の他の洗剤成分、例

例えば、ビルダー、漂白剤、漂白活性剤、腐食防止剤、金属イオン封鎖剤、汚れ解離ポリマー、香料、他の酵素、酵素安定剤、製剤化補助剤、蛍光増白剤、発泡促進剤等をも含有し得る。代表的なアニオン性界面活性剤は直鎖状アルキルベンゼンスルホネート (LAS)、アルキルスルフェート (AS)、アルファーオレフィンスルホネート (AOS)、アルコールエトキシスルフェート (AES) および天然脂肪酸のアルカリ金属塩等がある。ノニオン性界面活性剤の例としてはアルキルポリエチレングリコールエーテル、ノニルフェノールポリエチレングリコールエーテル、スクロース、およびグルコースの脂肪酸エステル、並びにポリエトキシ化アルキルグルコシドのエステル等がある。

本発明によるエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物は古紙に作用させることにより、脱インキが可能であることが見出された。これより、古紙から再生紙をつくる過程において本発明によるエンドグルカナーゼ酵素による処理で、残インキ繊維を大幅に減少させ、古紙の白色度を向上させることができる。本発明に用いられる古紙としては、例えば、機械パルプ、化学パルプを配合した新聞古紙、雑誌古紙、下級ないし中級印刷古紙、化学パルプよりなる上質古紙、これらの塗工紙等の印刷古紙が挙げられる。また、本発明に言う脱インキ薬品は、一般に古紙の脱インキに用いられる薬品をいい、 NaOH 、 Na_2CO_3 などのアルカリ、珪酸ソーダ、過酸化水素、燐酸塩、アニオン系またはノニオン系界面活性剤、オレイン酸等の補集材、助剤としてpH安定剤、キレート剤、分散剤等が挙げられる。

また、本発明によれば、紙パルプのろ水性が、強度の著しい低下を伴うことなく、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素による処理で有意に改善できることが見出された。したがって、本発明によれば、パルプのろ水性の改善方法であって、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で紙パルプを処理する工程を含んでなる方法が提供される。本発明で処理できるパルプの例としては、古紙パルプ、再循環板紙パルプ、クラフトパルプ、亜硫酸パルプまたは加工熱処理および他の高収率パルプが挙げられる。

また、本発明によるエンドグルカナーゼを動物飼料中で用いることにより、飼料中のグルカンの消化能を改善することができる。したがって、本発明によれば、

動物飼料の消化能を改善する方法であって、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で動物飼料を処理する工程を含んでなる方法が提供される。

実 施 例

本発明を以下の実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

エンドグルカナーゼ活性

以下において、エンドグルカナーゼ活性とは、CMCアーゼ活性を意味する。さらに、「CMCアーゼ活性」は、セルラーゼ酵素とカルボキシメチルセルロース (CMC、東京化成工業株式会社製) 溶液を一定時間インキュベーション後、遊離してくる還元糖量を測定し、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のグルコース相当の還元糖を生成する酵素量を 1 単位と定義する。

実施例 A 1 : リゾプス・オリゼーからのエンドグルカナーゼ酵素の単離精製
リゾプス・オリゼー CP96001 株 (FERM BP-6889) を、培地 (6.0% コーンステープリカー、3.0% 小麦フスマ、1.0% グルコース、0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15% CaCO_3) 中、28℃で振とう培養した。3日間培養の後、菌体を除去した培養上清液を粗精製セルラーゼ調製液とした。

この粗精製セルラーゼ調製液 80ml を最終濃度 1.25M 硫酸アンモニウムの溶液になるように調製した後、あらかじめ 1.25M の硫酸アンモニウム液で平衡化させた Macro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィー (ゲル体積 25ml、バイオラッドラボラトリーズ社製) に流速 3.4ml/min でアプライした。次に、脱イオン水中、硫酸アンモニウム濃度を 1.25M から 0.25M ずつのステップワイズ溶離法により流速 5.0ml/min で溶出して、分画した。このうち、硫酸アンモニウム濃度が 0.75M のときに得られた画分の一部にリヨセルの毛羽除去活性が強く認められた。そこでこの画分 50ml を分取した。この Macro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィーによる分画を 150 回繰り返し行なうことにより、培養上清液 12 l を処理し、活性画分 7.5 l を得た。

ここで得られた活性画分 7.5 l を最終濃度 1.25M 硫酸アンモニウムの溶液になるように調製した。そのうち 190ml を、あらかじめ 1.25M の硫酸アンモニウム液で平衡

化させたMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィー（ゲル体積25 ml、バイオラッドラボラトリーズ社製）に流速2.8ml/minでアプライした。次に、1.25M硫酸アンモニウム溶液、1.125M硫酸アンモニウム溶液をステップワイズで流速5.0ml/minで流した。次に脱イオン水約20mlで溶出した画分にリヨセルの毛羽除去活性が強く認められたので、プールした。この Macro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィーによる分画を40回繰り返し行なうことにより、前工程での活性画分7.5 l を処理し、活性画分800mlを得た。

次に、この活性画分800mlを50mM酢酸緩衝液（pH4.0）にて10倍希釈し、8.0lの溶液とし、そのうち23mlをあらかじめ50mM酢酸緩衝液（pH4.0）で平衡化させたMonoS HR 5/5 陽イオンクロマトグラフィー（ファルマシアバイオテク社製）に流速0.9ml/minでアプライした。次に、緩衝液A（50mM酢酸緩衝液、pH4.0）と緩衝液B（1M NaClを含む50mM酢酸緩衝液、pH5.2）のリニアグラジエントにより流速0.9ml/minで溶出した。そして、リヨセルの毛羽除去活性が強く認められた画分を分取した。この MonoS HR 5/5 陽イオンクロマトグラフィーによる分画を350回繰り返し行ない、精製エンドグルカナーゼ酵素RCE Iとして単離した。このRCE IはSDS-PAGEにおいて単一なバンドを示し、その分子量（MW）は約40kDであった。SDS-PAGEは、NPU-12.5L型パジェル（アトー株式会社製）を使用し、泳動および染色はゲルに添付の製品取扱説明書の方法に従った。分子量スタンダードは、SDS-PAGE分子量スタンダードLowレンジ（バイオラッドラボラトリーズ社製）を使用した。

実施例A 2：ムコール・サーシネロイデスからのエンドグルカナーゼ酵素の単離精製

ムコール・サーシネロイデスCP99001株（FERM BP-6890）を培地（3.0% コーンステープリカー、3.0% 小麦フスマ、3.0% グルコース、0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15% CaCO_3 ）中、28℃で振とう培養した。3日間培養の後、菌体を除去した培養上清液を粗精製セルラーゼ調製液とした。

この粗精製セルラーゼ調製液120mlを最終濃度1.5M硫酸アンモニウムの溶液になるように調製した後、あらかじめ1.5Mの硫酸アンモニウム液で平衡化させたMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィー（ゲル体積25ml、バイオラッ

ドラボラトリーズ社製)に流速3.0ml/minでアプライした。次に、脱イオン水中、硫酸アンモニウム濃度を1.5Mから0.3Mずつのステップワイズ溶離法により流速5.0ml/minで溶出して、分画した。このうち、硫酸アンモニウム濃度が0.6Mのときに得られた画分にリヨセルの毛羽除去活性が強く認められた。そこでこの画分64.3mlを分取した。このMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィーによる分画を14回繰り返し行なうことにより、培養上清液1710mlを処理し、活性画分900mlを得た。

ここで得られた活性画分のうち300mlを最終濃度1.5M硫酸アンモニウムの溶液になるように調製し、あらかじめ1.5Mの硫酸アンモニウム液で平衡化させたMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィー(ゲル体積25ml、バイオラッドラボラトリーズ社製)に流速3.0ml/minでアプライした。次に、1.5M硫酸アンモニウム溶液、0.9M硫酸アンモニウム溶液をステップワイズで流速5.0ml/minで流した。次に脱イオン水約30mlで溶出した画分にリヨセルの毛羽除去活性が強く認められたので、プールした。このMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィーによる分画を3回繰り返し行なうことにより、前工程での活性画分900mlを処理し、活性画分90mlを得た。

次に、この活性画分90mlを50mM酢酸緩衝液(pH4.0)にて10倍希釈し、900mlの溶液とし、そのうち150mlをあらかじめ50mM酢酸緩衝液(pH4.0)で平衡化させたMonoS HR 5/5 陽イオンクロマトグラフィー(ファルマシアバイオテック社製)に流速1.0ml/minでアプライした。次に、緩衝液A(50mM酢酸緩衝液、pH4.0)と緩衝液B(1M NaClを含む50mM酢酸緩衝液、pH5.2)のリニアグラジエントにより流速1.0ml/minで溶出した。そして、リヨセルの毛羽除去活性が強く認められた画分を分取した。このMonoS HR 5/5 陽イオンクロマトグラフィーによる分画を6回繰り返し行ない、精製エンドグルカナーゼ酵素MCE Iとして単離した。このMCE IはSDS-PAGEにおいて単一のバンドを示し、その分子量(MW)は約41kDであった。SDS-PAGEは、NPU-12.5L型パジェル(アトー株式会社製)を使用し、泳動および染色はゲルに添付の製品取扱説明書の方法に従った。分子量スタンダードは、SDS-PAGE分子量スタンダードLowレンジ(バイオラッドラボラトリーズ社製)を使用した。

実施例A 3 : ファイコマイセス・ニテンスからのエンドグルカナーゼ酵素の単離

精製

ファイコマイセス・ニテンスCP99002株 (FERM BP-6891) を、培地 (2.0% コーンステープリカー、3.0% 小麦フスマ、2.0% Sucrose、1.0% Yeast extract、0.05% KH_2PO_4 、0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15% CaCl_2 、0.01% アデカノール) 中、28℃、220rpmでJar培養を行なった。3日間培養の後、菌体を除去した培養上清液を分子量5000カットの膜にて10倍に限外ろ過濃縮を行なった。

この限外ろ過濃縮液120mlを最終濃度1.5M硫酸アンモニウムの溶液になるように調製した後、あらかじめ1.5Mの硫酸アンモニウム液で平衡化させたMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィー (ゲル体積25ml、バイオラッドラボラトリーズ社製) に流速3.0ml/minでアプライした。次に、脱イオン水中、硫酸アンモニウム濃度を1.5Mから0.3Mずつのステップワイズ溶離法により流速5.0ml/minで溶出して、分画した。このうち、硫酸アンモニウム濃度が0.3Mのときに得られた画分にリヨセルの毛羽除去活性が強く認められた。そこでこの画分66mlを分取した。このMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィーによる分画を10回繰り返し行なうことにより、限外ろ過濃縮液1200mlを処理し、活性画分660mlを得た。

ここで得られた活性画分のうち165mlを最終濃度1.5M硫酸アンモニウムの溶液になるように調製し、あらかじめ1.5Mの硫酸アンモニウム液で平衡化させたMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィー (ゲル体積25ml、バイオラッドラボラトリーズ社製) に流速3.0ml/minでアプライした。次に、1.5M硫酸アンモニウム溶液、0.75M硫酸アンモニウム溶液をステップワイズで流速5.0ml/minで流した。次に脱イオン水約30mlで溶出した画分にリヨセルの毛羽除去活性が強く認められたので、プールした。このMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィーによる分画を4回繰り返し行なうことにより、前工程での活性画分660mlを処理し、活性画分120mlを得た。

次に、この活性画分120mlを50mM酢酸緩衝液 (pH4.0) にて10倍希釈し、1200mlの溶液とし、そのうち100mlをあらかじめ50mM酢酸緩衝液 (pH4.0) で平衡化させたMonoS HR 5/5 陽イオンクロマトグラフィー (ファルマシアバイオテク社製) に流速1.0ml/minでアプライした。次に、緩衝液A (50mM酢酸緩衝液、pH4.0) と緩衝

液B（1M NaClを含む50mM酢酸緩衝液、pH5.2）のリニアグラジエントにより流速1.0ml/minで溶出した。そして、リヨセルの毛羽除去活性が強く認められた画分を分取した。この MonoS HR 5/5 陽イオンクロマトグラフィーによる分画を12回繰り返し行ない、精製エンドグルカナーゼ酵素PCE Iとして単離した。このPCE IはSDS-PAGEにおいて単一なバンドを示し、その分子量（MW）は約45kDであった。SDS-PAGEは、NPU-12.5L型パジェル（アトー株式会社製）を使用し、泳動および染色はゲルに添付の製品取扱説明書の方法に従った。分子量スタンダードは、SDS-PAGE分子量スタンダードLowレンジ（バイオラッドラボラトリーズ社製）を使用した。

実施例A 4：洗濯堅牢度試験機によるRCE I、MCE I、PCE Iの精製セルロース繊維への作用の評価

実施例A 1～3で得られた精製エンドグルカナーゼ酵素RCE I、MCE I、PCE Iの、精製セルロース繊維の代表例であるリヨセルの毛羽除去活性を以下のように評価した。

あらかじめ染色されたりヨセルニットの生地（豊島株式会社製）を界面活性剤およびゴムボールとともに大型ワッシャー中で毛羽立たせた。その後、この毛羽立たせたりヨセルニットの生地（豊島株式会社製 9cm×10cm、重量約2g）を筒状に縫い、下記の条件で各種酵素による毛羽除去処理を行った。この処理により筒状の生地の内側にある毛羽が完全に除去されるのに要するRCE I、MCE I、PCE Iのタンパク濃度を算出した。

各種エンドグルカナーゼのタンパク濃度は、TSKgel TMS-250カラム（4.6mmI. D. X7.5cm）（東ソー社製）を用いたHPLC分析により、0.05%TFA（トリフルオロ酢酸）中、アセトニトリル濃度を0%から80%までのリニアグラジエントにより流速1.0ml/minで溶出した各種エンドグルカナーゼのUV280nmでのピーク面積から算出した。スタンダードとしては、プロテインアッセイキット（バイオラッドラボラトリー社製）によりあらかじめタンパク濃度を測定しておいた精製NCE 4を同じくHPLC分析したものを用いた。プロテインアッセイキットにおけるタンパク濃度測定のスタンダードはAlbumin Standard(Bovine serum albumin, fraction V, PIERCE社製)を用いた。また、精製NCE 4はW098/03640号記載の方法に従い、フ

ミコーラ・インソレンス培養液から単離精製した。

試験機械：ラウンダーメーター (Launder Meter) L-12 (株式会社大栄科学精器製作所製)

温度：RCEIは55℃、MCEI、PCEIは50℃で反応させた。

時間：60分

反応液量：40 ml

反応pH：pH5 (10mM酢酸緩衝液)

pH6 (10mM酢酸緩衝液)

処理液には、エンドグルカナーゼ溶液とともに約16gのゴムボールを4個加えた。

その結果は、下記の第1表に示されるとおりであった。

第 1 表		
酵素	pH 5	pH 6
RCEI	0.5 mg / l	0.5 mg / l
MCEI	0.5 mg / l	0.5 mg / l
PCEI	1.4 mg / l	0.9 mg / l

実施例 A 5：洗濯堅牢度試験機による各pHにおけるRCEI、MCEI、PCEIの精製セルロース繊維への作用の評価

あらかじめ染色されたりヨセル (豊島株式会社製) 生地を界面活性剤およびゴムボールとともに大型ワッシャー中で毛羽立たせた。その後、下記の条件でRCEI、MCEI、PCEIによるりヨセルの毛羽除去処理を行なうことにより、形成された毛羽が完全に除去されるのに要する各種エンドグルカナーゼのタンパク濃度を各pHにおいて算出した。最も強い活性を示すpH領域での活性値を100とし、各pHにおける活性値はその相対活性によって、グラフに示した。また、対照として、W098/03640号で開示されているフミコーラ・インソレンス由来のエンドグルカナーゼ成分である精製NCE4を同様に評価した。

各種エンドグルカナーゼのタンパク濃度は、TSKgel TMS-250カラム (4.6mm I.D. X7.5cm) (東ソー社製) を用いたHPLC分析により、0.05%TFA (トリフルオロ酢酸) 中、アセトニトリル濃度を 0% から 80% までのリニアグラジエントにより流速1.0ml/minで溶出した各種エンドグルカナーゼのUV280nmでのピーク面積から算出した。スタンダードとしては、プロテインアッセイキット (バイオラッドラボラトリー社製) によりあらかじめタンパク濃度を測定しておいた精製NCE4を同じくHPLC分析したものを用いた。プロテインアッセイキットにおけるタンパク濃度測定のスランダードはAlbumin Standard (Bovine serum albumin, fraction V, Pierce社製) を用いた。

試験機械：ラウンダーメーター (Launder Meter) L-12 (株式会社大栄科学精器製作所製)

温度：NCE4、RCEIは55℃、MCEI、PCEIは50℃で反応させた。

時間：60分

反応液量：40ml

反応pH：4～6 (10mM酢酸緩衝液)

7～9 (10mMトリスー塩酸緩衝液)

9～10 (10mMグリシンー水酸化ナトリウム緩衝液)

処理液には、エンドグルカナーゼ溶液とともに約16gのゴムボールを4個加えた。

その結果は、図1に示されるとおりであった。図から明らかなように、RCEI、MCEI、PCEIの至適pHは5～7であり、pH5～8の範囲で至適pHにおける活性の70%以上の活性を有していた。一方、対照であるNCE4の至適pHは5であり、pH6.2以上では至適pHにおける活性の30%以下の活性しかなかった。RCEI、MCEI、PCEI がアルカリ条件下において優位に高活性であることがこの結果より明らかである。

実施例A6：RCEIによるデニム染めセルロース含有繊維の脱色活性の評価

実施例A1で得られた粗精製セルラーゼ調製液と、精製エンドグルカナーゼ酵

素RCE I を用いて糊抜きした 12オンスのブルージーンズパンツを下記の条件で脱色処理をした。

試験機械：20kgワッシャー（三洋電機株式会社製 全自動洗濯機 SCW5101）

温度：55℃

時間：60分

pH：6.2（6.7mMリン酸緩衝液）

処理液には、セルラーゼ調製液とともにゴムボールを適当量加えた。

脱色度を分光測色計（ミノルタ社製 CM-525i）を用いた。まず、観察条件設定において光源をD₆₅、観察条件を2°視野にすることによって、製品のマニュアルに従い、L*a*b*表色系のL*値（明度）の校正を行なった。次に、この条件での各種サンプルのL*a*b*表色系のL*値を測定した。コントロール（未処理繊維）に対するL*値の増加（白色度の増加）＝ΔL*値を求め、このΔL*値により脱色の度合いを評価した。すなわち、各試験区につき10点のΔL*値を測定し（n=10）、その平均値を算出した。そして、ΔL*値＝7 となるのに必要なエンドグルカナーゼのタンパク濃度を算出した。

タンパク濃度はプロテインアッセイキット（バイオラッドラボラトリー社製）を用い、牛血清アルブミンをスタンダードとして定量した。

その結果は、次の第2表に記載の通りであった。

第 2 表

試料	タンパク濃度
粗精製セルラーゼ調製液	80.0 mg / l
RCE I	2.0 mg / l

実施例A 7：RCE I の各種繊維に対する減量加工試験

あらかじめ絶対乾燥重量を測定してある各種セルロース含有繊維（15cm×10cm）を下記の条件で酵素処理した。

試験機械：ラウンダーメーター（Launder Meter）L-12（株式会社大栄科学精器製作所製）

温度：55℃

時間：60分

pH：6（10mM酢酸緩衝液）

処理液には、RCE I 調製液（タンパク濃度 8.0mg/L）とともにステンレスビーズ（株式会社大栄科学精器製作所）を適当量加えた。タンパク濃度はプロテインアッセイキット（バイオラッドラボラトリー社製）を用い、牛血清アルブミンをスタンダードとして定量した。

酵素処理の前後で布の絶対乾燥重量を測定し、重量減少率を算出した。その結果は、下記の表に示される通りであった。

被験布	減量率（%）
綿ニット	2. 7 9
麻	1. 4 9
レーヨン	2. 8 3
ポリノジック	1 1. 3 2
リヨセル	3. 4 7

実施例 B 1：RCE I、MCE I、PCE Iの部分アミノ酸配列

(1) N末端アミノ酸残基の同定

実施例 A 1～3 において得られた精製したタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定するため、Model 172 μ プレパラティブ HPLC システム（パーキンエルマ社製）でカラムクロマトグラフィーを行い（カラム：C8 220×2.1mm、0.1%TFA、5%アセトニトリル～0.085%TFA、70%アセトニトリルグラジエント）、目的タンパク質を更に純化した。これをプロテインシーケンサー Model 492（パーキンエルマ社製）に供し、N末端側アミノ酸配列を決定した。得られた配列は以下の通りであった。

RCEI の N 末端アミノ酸配列（配列番号 14）：

Ala-Glu-(Cys)-Ser-Lys-Leu-Tyr-Gly-Gln-(Cys)-Gly-Gly-Lys-Asn-Trp-Asn-

* * * *

Gly-Pro-Thr-(Cys)-(Cys)-Glu-Ser-Gly-Ser-Thr-(Cys)-Lys-Val-Ser-Asn-Asp-
* * *

Tyr-Tyr-Ser-Gln-(Cys)-Leu-Pro-Ser (40残基)

MCEIのN末端アミノ酸配列 (配列番号 15) :

Ala-Ser-(Cys)-Ser-Ser-Val-Tyr-Gly-Gln-(Cys)-Gly-Gly-Ile-Gly-Trp-Ser-

Gly-Pro-Thr-(Cys)-(Cys)-Glu (22残基)

PCEIのN末端アミノ酸配列 (配列番号 16) :

Ala-Glu-(Cys)-Ser-Gln-Gly-Tyr-Gly-Gln-(Cys)-Gly-Gly-Lys-Met-Trp-Thr-

Gly-Pro-Thr-(Cys)-(Cys)-Thr-Ser (23残基)

(2) ペプチドマッピング

上記 (1) において精製されたRCEIタンパク質を凍結乾燥後、50mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した。タンパク質に対し約1/100モル量のリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬社製) を添加し、37℃、48時間反応させた。この分解産物を、前述HPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い (カラム: C18 220×2.1mm、0.1% TFA、5%アセトニトリル〜0.085% TFA、35%アセトニトリルグラジェント)、5種のペプチドを分取した。得られたペプチド断片のアミノ酸配列を前述のプロテインシーケンサーにより決定した。その結果は以下に示されるとおりであった。

LE-1 : Asn-Ala-Asp-Asn-Pro-Ser-Met-Thr-Tyr-Lys (10残基) (配列番号 38)

LE-2 : Tyr-Ser-Ala-Val-Ser-Gly-Gly-Ala-Ser-Gly (10残基) (配列番号 39)

LE-3 : Ser-Ala-Ser-Asp-(Cys)-Ser-Ser-Leu-Pro-Ser-Ala-Leu-Gln-Ala-Gly-(Cys)-Lys (17残基) (配列番号 40)

LE-4 : Tyr-Gly-Gly-Ile-Ser-Ser-Ala-Ser-Asp-(Cys)-Ser-Ser-Leu-Pro-Ser-Ala-Leu-Gln (18残基) (配列番号 41)

LE-5 : Arg-Phe-Asn-Trp-Phe-Lys (6残基) (配列番号 4 2)

* * * * *

実施例 B 2 : ゲノムDNAの単離

ゲノムDNAの単離は、以下の様にして行った。

リゾプス・オリゼーは30mlの YPD液体培地 (1% 酵母エキス (Difco社製)、2% ポリペプトン (和光純薬社製)、2% スクロース) で30℃、40時間培養し、ムコール・サーシネロイデスは30mlの YPD液体培地 (0.5% 酵母エキス (Difco社製)、2.4% ポテトデキストロースブロス (Difco社製)、2% スクロース) で30℃、18時間培養し、ファイコマイセス・ニテンスは30mlの YPD液体培地 (0.5% 酵母エキス (Difco社製)、2.4% ポテトデキストロースブロス (Difco社製)、2% スクロース) で30℃、48時間培養した。各培養液はガラスフィルターによって菌体を集菌した。得られた各菌体を凍結乾燥し、ブレンダーにて細かく破碎した後、TE (10mM トリス塩酸 (pH 8.0)、1mM EDTA) 緩衝液 8ml に溶解した。これに 10% SDSを含む TE 緩衝液4mlを加え、60℃、30分間保温した。その後、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を12 ml加え、激しく振とうした。遠心後、水層を別の容器に移し、これに1mlの 5 M酢酸カリウムを加え、氷中に1時間以上放置した。遠心後、水層を別の容器に移し、2.5容のエタノールを加え、DNA を沈殿させた。沈殿を乾燥させた後、5mlの TE緩衝液 に溶解し、10 mg/ml のリボヌクレアーゼA (RNase A) 溶液を5 μ l加え、37℃、1時間保温し、更に20 mg/ml プロティナーゼK (proteinase K) 溶液 50 μ lを加え、37℃、1時間保温した。その後、3mlのポリエチレングリコール溶液 (20% PEG6000、2.5 M NaCl) を加えて DNA を沈殿させた。沈殿を500 μ lのTE緩衝液に溶解し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を2回行い、エタノール沈殿をした。沈殿を70%エタノールで洗浄後、乾燥し、適当量のTE緩衝液に溶解して試料とした。

実施例 B 3 : PCR法による長鎖プローブの作製

(1) PCR法による目的 DNA 断片の増幅

DNAプローブとして、リゾプス・オリゼーの全DNAを鋳型にPCR法により増幅したロングプローブを作製した。

各プライマーとして、N末端およびペプチド LE-5の*で示したアミノ酸に対応するDNAを合成した。作製した合成オリゴヌクレオチドの配列は以下に示される通りであった。

Rh-N : AARAAYTGGAAYGGXCCNAC (20mer) (配列番号 4 3)

Rh-4. 3a : TTRAACCARTTRAANCG (17mer) (配列番号 4 4)

Rh-4. 3b : TTRAACCARTTRAAYCT (17mer) (配列番号 4 5)

(R : AまたはG、Y : CまたはT、N : A、G、C、またはT、X : イノシン)

PCR反応は以下の条件で行った。まず、リゾプス・オリゼーのゲノム DNA 1 μ g に対し、プライマーとして Rh-NおよびRh-4. 3a を各1 μ M加えたもの、Rh-NおよびRh-4. 3b を各1 μ M加えたものの2組のチューブを作製し、これらを、dNTP存在下、95℃、2分間熱変性を行った。その後、Taqポリメラーゼ（リコンビナントTaq、宝酒造社製）を加え、94℃ 1分間、45℃ 2分間、72℃ 3分間の反応条件を 25回繰り返した後、72℃で 10分間インキュベートした。このPCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動に供した結果、プライマーとして Rh-NおよびRh-4. 3bを用いた場合のみ、約800bpのDNAが増幅していた。

(2) PCR産物のサブクローニング

前述約800bpのPCRにて増幅されたDNA断片をセファグラスバンドプレップキット（ファルマシアバイオテク社製）を用いて回収し、これをpT7ブルーTベクター（pT7 Blue T-vector、ノバジェン社製）に、DNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結した。得られた連結混合物で大腸菌 JM109株コンピテントセル（E. coli competent cells JM109、宝酒造社製）を形質転換した。得られた形質転換体を培養した後、Molecular Cloning に記載される方法によりプラスミドDNAを回収した（J. Sambrock, in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd Ed., ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, ppl. 25-1. 32. ）。得られたプラスミドDNAを複数の制限酵素によって切断した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約800bpの断片が挿入されたプラスミドDNAを選択した。目的のPCR産物がサブクローニングされたプラスミドをpRD05とした。

(3) pRD05 の塩基配列の解析

塩基配列解析は以下の様に進めた。

塩基配列解析装置は、A. L. F. DNAシーケンサーII（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。シーケンシングゲルは、ハイドロリンクロングレンジャー（FMC社製）として入手可能なアクリルアミド担体を使用した。ゲル作成用各種試薬（N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン、尿素、および過硫酸アンモニウム）はA. L. Fグレードの試薬（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。塩基配列解読反応は、オートリードシーケンシングキット（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。ゲル作製条件、反応条件、および泳動条件の各々は、各説明書の詳細を参照し、設定した。

テンプレートDNA、pRD05をアルカリ変性後、オートリードシーケンシングキット添付のユニバーサルおよびリバーズプライマーとアニーリングさせ、伸長反応を行った。反応産物をシーケンサーで解読したところ、それぞれ約400bpの塩基配列が判明した。これらの結果から、後記するRCE1-01～06 と呼ぶFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、pRD05 に対して反応させ、さらに解読を進めた。その結果、pRD05の挿入断片の全塩基配列が解読された。解読された塩基配列はをアミノ酸配列に翻訳したところ、一つの読み枠が、実施例B 1において示されたエンドグルカナーゼ RCE I の部分アミノ酸配列の一部と一致した。よってこのプラスミドpRD05に含まれる挿入DNAを以降のスクリーニングのプロープとして用いることとした。

RCE-01: 5'-CAATGTCTTCCCTCTGGAAGCAG-3' (23mer) (配列番号 4 6)

RCE-02: 5'-TGCCCTTAGTGACAGCAATGCCC-3' (23mer) (配列番号 4 7)

RCE-03: 5'-CTTCCTTCCGCACTCCAAGCTGG-3' (23mer) (配列番号 4 8)

RCE-04: 5'-CCAGCTTGGAGTGCGGAAGGAAG-3' (23mer) (配列番号 4 9)

RCE-05: 5'-TCACTAAGGGCAGTGACACCATC-3' (23mer) (配列番号 5 0)

RCE-06: 5'-CAGAGGGAAGACATTGAGAGTAG-3' (23mer) (配列番号 5 1)

実施例B 4：ゲノムDNAライブラリー（Sau3A I ライブラリー）の作製

リゾプス・オリゼーのゲノムDNAをSau3A Iにより消化し、アガロースLE（ナカライテスク社製）を用いた0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。ゲノムDNAが、9～23kbpの範囲で限定的に分解されたことを確認した後、このDNA断片を定法に従い、抽出、精製した。このDNA断片をファージベクター、Lambda DASH II ベク

ター（ストラタジーン社製）に連結した。これをエタノール沈殿後、TE緩衝液に溶解し、この全量をギガパックIIパッケージングキット（ストラタジーン社製）を用いて、ラムダヘッドにパッケージし、得られたファージを大腸菌 XL1-Blue MRA株に感染させた。この方法により得られた 5×10^4 個のファージライブラリーを用いて目的遺伝子のクローニングを行った。

実施例 B 5 : RCE I 遺伝子のクローニング

（１）プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニング

まず、実施例 B 3 において得られたプラスミド pRD05 を BamH I で分解した後、0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、約 800bp の DNA 断片を回収した。これを ECL ダイレクト DNA/RNA ラベリング検出システム（アマシャム社製）により標識化した。

次に、実施例 B 4 に従って得られたゲノム DNA ライブラリー（Sau3A I ライブラリー）をナイロンメンブラン（ハイボンド N+ ナイロントランスファーメンブラン、アマシャム社製）にうつしとり、0.4N 水酸化ナトリウムで DNA を固定し、5 倍濃度 SSC（1×SSC、15mM クエン酸 3 ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム）で洗浄し、乾燥させ DNA を固定した。キットの方法に従って、1 時間のプレハイブリダイゼーション（42℃）の後、先の標識化したプローブを添加し、15 時間（42℃）ハイブリダイゼーションを行った。ラベルの洗浄は前述キット添付の説明書の方法に従った。まず、0.4% SDS、6M 尿素添加 0.5 倍濃度 SSC で 42℃、20 分間の洗浄を 2 回繰り返す、次に 2 倍濃度 SSC で室温、5 分間の洗浄を 2 回行った。プローブの洗浄を行ったナイロン膜を、添付されている検出溶液に 1 分間浸したあと、フジメディカル X 線フィルム（富士写真フィルム社製）に感光させ、2 個のファージクローンを得た。

（２）ファージ DNA の調製

大腸菌 XL1-Blue MRA 株にファージを感染させ、18 時間後ファージ粒子を集めた。これら粒子を、Grossberger の方法（Grossberger, D., Nucleic Acids. Res. 15 6737, 1987）に準じてプロテイナーゼ K およびフェノール処理を行った後、エタノール沈殿により、ファージ DNA を分離した。

（３）目的遺伝子のサブクローニング

2 種のファージ DNA を複数の制限酵素で切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動に

供した。DNAをSouthernの方法 (Southern, E. M., J. Mol. Biol. 98:503-517, 1975) により、ナイロンメンブランにうつしとり、実施例B 5 (1) と同様にハイブリダイゼーションした。その結果、2種のファージDNAは、複数の制限酵素の切断によっても共通のハイブリダイゼーションのパターンを示した。また、2種のファージDNAをXba Iで切断した場合に、約3.5 kbp の一本のバンドに共通にハイブリダイズした。このため、このバンドを回収し、プラスミドpUC119のXba Iサイトにサブクローニングを行った。得られたプラスミドをpRCE I-Xbaとした。

実施例B 6 : RCE I 遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列の決定を実施例B 3 (3) と同様の方法により行った。即ち、テンプレートDNA として実施例B 5において得られたプラスミドpRCE I-Xbaを用い、プライマーとしてRCE 01~06の FITC 標識シーケンシングプライマーを用いて反応を行い、解析した。それらの結果より、更に下記のRCE1-07~09と呼ぶFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、各々とプラスミドpRCE I-Xbaを反応させ解析し、エンドグルカナーゼRCE I 遺伝子の全塩基配列を決定した。

RCE-07: 5'-ACAACATTATTTCTTCAAACATG-3' (23mer) (配列番号5 2)

RCE-08: 5'-AAATGCCGCATCAAGTTTTATTG-3' (23mer) (配列番号5 3)

RCE-09: 5'-TTCACCTTCTACCTCTGTTGCTGG-3' (23mer) (配列番号5 4)

実施例B 7 : RCE I 遺伝子の発現

(1) RCE I 遺伝子への部位特異的変異導入

RCE I 遺伝子の開始コドンのすぐ上流および終止コドンのすぐ下流に Bgl II サイトを以下のように部位特異的変異により導入した。

まず、下記の2種の合成オリゴヌクレオチド pIN-BglおよびpIC-Bgl を変異導入用プライマーとして作製し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (和光純薬社製) を用いてそれぞれの 5' 末端を予めリン酸化しておいた。

次に、ミュータジェンM13 インビトロミュータジェネシスキット (Muta-Gene in vitro Mutagenesis Kit、バイオラッドラボラトリー社製) を用いて部位特異的変異導入を行った。即ち、プラスミドpRCE I-Xbaで大腸菌 CJ236 株を形質転換した後、ヘルパーファージ M13 K07 を感染させ、一本鎖DNA (ssDNA) を得た。このpRCE I-Xba ssDNAとリン酸化したプライマー pIN-Bgl、pIC-Bgl をアニーリン

グさせた後、ポリメラーゼ反応により二本鎖化し、大腸菌JM109株に導入し、変異DNAを得た。この変異導入プラスミドをpRCE I -Bglとした。

pIN-Bgl: 5'-GTAATAAACTTCATAGATCTATGTAAAAAGAATG-3' (34mer) (配列番号 5 5)

pIC-Bgl: 5'-GGATGAGTATAAAAGATCTTATTTTCTTGAAC-3' (32mer) (配列番号 5 6)

(2) RCE I 遺伝子の酵母における発現

RCE I 遺伝子を酵母において発現させるために、W097/00757号明細書に記載される宿主-ベクター系を用いて、以下の検討を行った。

即ち、実施例 B 7 (1) において得られたプラスミドpRCE I -BglをBgl IIで切断し、RCE I 遺伝子を回収した。これを、プラスミドベクターpY2831のBamH I サイト、即ちグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAP) プロモーターの下流に作動可能に連結し、プラスミドpYRCE Iを得た。このプラスミドにより上記明細書に従って酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MS-161株 (MATa, trp1, ura3) を形質転換し、エンドグルカナーゼRCE Iが発現可能な形質転換体を得た。

実施例 B 8 : 酵母において発現したRCE I の評価

(1) RCE I が発現した酵母の培養

実施例 B 7 において得られたプラスミドpYRCE I による酵母の形質転換体を、50 μ g/ml のウラシルを添加した SD液体培地 (0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acids (ディフコ社製)、2% グルコース) にて、30℃、24時間培養した。この前培養液を終濃度 1%となるように、50 μ g/ml のウラシルおよび1% カザミノ酸を添加したSD液体培地にシードし、30℃、36時間間培養した。培養後、遠心分離により酵母菌体を除去し、これを粗酵素液として種々の解析に用いた。

(2) SDS-PAGEによる分子量の測定

実施例 B 8 (1) において得られた粗酵素液をSDS-PAGEに供したところ、分子量が約100~200kDのスメアなバンドとして検出された。

(3) RCE I が発現した酵母の評価 (CMCアーゼ活性)

実施例 B 8 (1) において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、RCE I 遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果は、下記の表に示される通りであった。

CMCアーゼ (U/ml)	
RCE I 遺伝子組み換え株	1.270
コントロール	0.000

(4) RCE I が発現した酵母の評価 (リヨセル毛羽除去活性)

実施例 B 8 (1) において得られた粗酵素液を透析した後、実施例 A 4 と同様に pH6、55℃ におけるリヨセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、RCE I 遺伝子が導入されていないベクター DNA のみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果、RCE I 遺伝子組み換え株の 0.5ml プロス/ml による処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。また、コントロールも同様に、0.5ml プロス/ml の反応液による処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。

実施例 B 9 : 変異型エンドグルカナーゼ RCE I の発現

実施例 B 8 において、酵母で発現させたエンドグルカナーゼ RCE I は、CMCアーゼ活性は示すものの、リヨセル毛羽除去活性は示さなかった。また、実施例 B 8 (2) において測定された分子量は、予想される分子量より大きいものであった。

酵母において異種タンパク質を発現させた場合、時として過グリコシル化 (過剰な糖鎖の付加) が起きることが Van Arsdelら (Van Arsdel, J. N., 1987, Bio Technology 5, 60-64) によって報告されている。実施例 B 8 におけるエンドグルカナーゼ RCE I を酵母において発現させた場合においても同様の現象がおきていると考えられた。そこで、リヨセル毛羽除去活性を示すエンドグルカナーゼ RCE I を酵母において発現させるため、アスパラギン結合型 (Asn型) 糖鎖認識部位のアミノ酸を置換した変異型エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子を作成した。

(1) RCE I 遺伝子への部位特異的変異導入

Asn型糖鎖の認識部位 Asn-X-Ser/Thrは、酵母および哺乳動物の糖タンパク質において共通であることが、Lehle ら (Lehle, L., and Bause, E. 1984, Biochim. Biophys. Acta, 799, 246-251) によって報告されている。

エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子には、この配列が3カ所あり、配列番号 1 のア

ミノ酸配列上のそれぞれ 45 番目、90 番目、および 130 番目の位置のアスパラギン残基に糖鎖が結合すると考えられた。Asn 型糖鎖の付加されない変異型エンドグルカナーゼ RCE I を酵母において発現させるために、RCE I 遺伝子に部位特異的変異導入を行った。

部位特異的変異処理は、実施例 B 7 (1) の方法に従った。即ち、まず、3 種の合成オリゴヌクレオチド 下記の pIRI-S47A、pIRI-S92G、および pIRI-N130D を変異導入用プライマーとして作製し、5' 末端を予めリン酸化した。

次に、プラスミドを pRCE I -Bgl で大腸菌 CJ236 株を形質転換し、ヘルパーファージを用いて ssDNA を得た。この ssDNA とプライマーを前述キットを用いてアニーリング、ポリメラーゼ反応により、二本鎖化し、大腸菌 JM109 株に導入することで変異 DNA を得た。この変異導入プラスミドを pRCE I -NLCD とした。

pIRI-S47A 5'-CACTTTCAGAAGCTTTATTGCCAC-3' (24mer) (配列番号 57)

pIRI-S92G 5'-GAGCTAGAGCCAGAGTTAGAAG-3' (22mer) (配列番号 58)

pIRI-N130D: 5'-GAGAACTGACATCGGCCTTACC-3' (22mer) (配列番号 59)

(2) 変異型エンドグルカナーゼ RCE I の酵母における発現

変異型エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子の酵母における発現を、実施例 B 7 (2) の方法に準じて行った。即ち、実施例 B 9 (1) において得られたプラスミド pRCE I -NLCD I を Bgl III で切断し、変異型セルラーゼ RCE I 遺伝子を回収した。これを、プラスミドベクター pY283I の GAP プロモーターの下流の BamH I サイトに作動可能に連結し、プラスミド pYI-NLCD を得た。このプラスミドを用いて、酵母 MS-161 株を形質転換し、変異型エンドグルカナーゼ RCE I が発現した形質転換体を得た。

実施例 B 10 : 酵母において発現した変異型エンドグルカナーゼ RCE I の評価

(1) 変異型 RCE I が発現した酵母の培養

実施例 B 9 において得られたプラスミド pYI-NLCD による酵母の形質転換体を、実施例 B 8 (1) と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

(2) SDS-PAGE による分子量の測定

実施例 B 10 (1) において得られた粗酵素液を SDS-PAGE に供したところ、分子量が約 40~45kD のスミアなバンドとして検出された。

(3) 変異型 RCE I が発現した酵母の評価 (CMC アーゼ活性)

実施例 B 1 0 (1) において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCE I 遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果は、下記の表に示される通りであった。

	CMCアーゼ (U/ml)
変異型RCE I 遺伝子組み換え株	1.100
コントロール	0.000

(4) 酵母で発現させた変異型RCEIのリヨセルの毛羽除去の評価

実施例 B 1 0 (1) において得られた粗酵素液を透析した後、実施例 A 4 と同様にpH6、55℃におけるリヨセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCE I 遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して同様の評価を行った。

その結果、変異型RCE I 遺伝子組み換え株から得られた0.1mlブロス/mlの反応液で処理を行った場合、80%の毛羽が除去されていた。一方、コントロールは0.5mlブロス/mlの反応液で処理を行ったが、まったく毛羽は除去されていなかった。

この結果から、RCE I を酵母においてリヨセル毛羽除去活性を示すように発現させるためには、Asn型糖鎖認識部位に糖鎖が付加されないようにアミノ酸を置換する必要があることが確かめられた。また、毛羽を完全に除去するのに必要なタンパク質の量をSDS-PAGE後の染色の程度で測定した。その結果、実施例 A 1 に示した方法により精製したエンドグルカナーゼRCE I と、酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼRCE I とでほぼ同等であった。

(5) 酵母で発現させた変異型RCEIの各pHにおけるリヨセルの毛羽除去の評価

実施例 B 1 0 (1) において得られた粗酵素液を用いて、実施例 A 5 と同様にpH4～9におけるリヨセル毛羽除去活性を測定した。

その結果は、図2に示されるとおりであった。図から明らかなように、変異型RCE I の至適pHは7～8であり、pH5.2～8.6の範囲で至適pHにおける活性の80%以上の活性を有していた。酵母で発現させた変異型RCE I が、リゾプス・オリゼーより

精製したRCE I とほぼ同様のpH特性を示すことが明らかとなった。

実施例 C 1：リゾプス・オリゼーにおけるRCE I 遺伝子の相同体遺伝子の検索
リゾプス・オリゼーのゲノムDNA中のエンドグルカナーゼRCE I 遺伝子の相同体遺伝子を検索するために、サザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。

まず、実施例 B 2 に従って得られたリゾプス・オリゼーのゲノムDNA約10 μ g を複数の制限酵素 (EcoR I、BamH I、Hind III、Sac I、Xba I、Sal I 等) で各々切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。これを実施例 B 5 (3) に従って、メンブランにうつしとり、前述実施例と同一の条件にてハイブリダイゼーションした。その結果、リゾプス・オリゼーのゲノムDNA上には、エンドグルカナーゼRCE I 遺伝子の他に少なくとも2種類の相同な遺伝子が存在することが明らかになった。RCE I 遺伝子を含め、これら3種類の遺伝子は、特にゲノムDNAをSac I で切断した場合のハイブリダイゼーションにおいて、それぞれ一本のバンドとして検出された。そのため、約3kbp のバンドとして検出される遺伝子をRCEII遺伝子、約10kbpのバンドとして検出される遺伝子をRCEIII遺伝子として、以降のクローニングを行った。

実施例 C 2：エンドグルカナーゼRCEII遺伝子のクローニング

(1) ゲノムDNAライブラリー (RCEII遺伝子クローニング用) の作製

リゾプス・オリゼーのゲノムDNAをSac Iにより消化し、アガロースLEを用いた0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約2~4 kbpの大きさのDNA断片を定法に従い、抽出、精製した。このDNA断片をファージベクター、Lambda ZAP IIベクター (ストラタジーン社製) に連結し、実施例 B 4 と同様にパッケージングを行った。得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRF' 株に感染させた。この方法により得られた1 \times 10⁵個のファージライブラリーを用いてRCEII遺伝子のクローニングを行った。

(2) RCEII遺伝子のクローニング

実施例 C 2 (1) で得られたライブラリーと、実施例 B 3 で得られた長鎖プローブを用いて、プライクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、実施例 B 5 と同様の条件にて行い、3個のファージクローンを得た。

得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRF' 株に感染させ、実施例B 5 (2)の方法に従って DNA を調製し、Sac Iで切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。これを実施例B 5 (3)の方法に従って、ナイロンメンブランにうつしとり、ハイブリダイゼーションした。その結果、3種のファージDNAにおいて、ゲノムDNAと同一のサイズの共通の約3kbpのバンドが検出された。このバンドを回収し、プラスミド pUC118のSac Iサイトにサブクローニングを行い、得られたプラスミドを pRCEII-Sacとした。

実施例C 3 : エンドグルカナーゼRCEII遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列の決定は、実施例B 3 (3)と同様に行った。即ち、テンプレートDNAとして実施例C2において得られたプラスミドpRCEII-Sacを用い、プライマーとして 実施例B 3 (3)において作成したRCE 03、04、および05のFITC標識シーケンシングプライマーを用いて反応を行い、解析した。この結果から、新たなFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、pRCEII-Sac に対して反応させ、さらに解読を進めた。得られた結果から、さらに次のプライマーを作製して解読を進め、RCEIIの塩基配列を決定した。

RCEII-01: 5'-ACAACATTATTTCTTCGAATATG-3' (23mer) (配列番号60)

RCEII-02: 5'-TTTAGCAGCAGAGGCCATTTTCAG-3' (23mer) (配列番号61)

RCEII-03: 5'-TTTTCTATCCTGATACAGAGATG-3' (23mer) (配列番号62)

RCEII-04: 5'-GCGCTCATAAAACGACTACTACC-3' (23mer) (配列番号63)

RCEII-05: 5'-TGCCCTTAGTGACAGCAATGTCC-3' (23mer) (配列番号64)

実施例C 4 : エンドグルカナーゼRCEII遺伝子の発現

(1) RCEII遺伝子への部位特異的変異導入

RCEII遺伝子の開始コドンのすぐ上流および終止コドンのすぐ下流にBgl II サイトを部位特異的変異により導入した。部位特異的変異導入の方法は実施例B 7 (1)に従った。

まず、下記の合成オリゴヌクレオチドpIIC-Bglを変異導入用プライマーとして新たに作製し、先に実施例B 7 (1)にて合成したpIN-Bglと共に5'末端をリン酸化した。

次に、プラスミドpRCEII-Sacを大腸菌CJ236株にて一本鎖化した後、リン酸化し

たプライマーと反応させ、変異DNAを得た。この変異導入プラスミドをpRCEII-Bgl Iとした。

pIIC-Bgl: 5'-CAAGAAAATAAGATCTTTTATACTCCTACT -3' (30mer) (配列番号 65)

(2) RCEII遺伝子の酵母における発現

RCEII遺伝子の酵母における発現を実施例B 7(2)の方法にしたがって行った。即ち、実施例C 4(1)において得られたプラスミドpRCEII-Bgl IをBgl IIで切断し、エンドグルカナーゼRCEII遺伝子を回収した。これを、プラスミドベクターpY283 1のBamH Iサイト、即ちグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAP) プロモーターの下流に作動可能に連結し、プラスミドpYRCEIIを得た。このプラスミドにより、W097/00757号明細書に従って、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MS-161株 (MATa, trp1, ura3) を形質転換し、エンドグルカナーゼRCEIIが発現し得る形質転換体を得た。

実施例C 5: 酵母において発現したエンドグルカナーゼRCEIIの評価

(1) RCEIIが発現した酵母の培養

実施例C 4において得られたプラスミドpYRCEIIによる酵母の形質転換体を実施例B 8(1)と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

(2) SDS-PAGEによる分子量の測定

実施例C 4(1)において得られた粗酵素液をSDS-PAGEに供したところ、分子量が約100~200kDのスメアなバンドとして検出された。

(3) RCEIIが発現した酵母の評価 (CMCアーゼ活性)

実施例C 4(1)において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、RCEII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

	CMCアーゼ (U/ml)
RCEII遺伝子組み換え株	0.260
コントロール	0.000

(4) 酵母で発現させた変異型RCEIIのリヨセルの毛羽除去の評価

実施例C 5 (1) において得られた粗酵素液を透析した後、実施例A 4と同様にpH6、55℃におけるリヨセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、RCEII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果、RCEII遺伝子組み換え株の0.5mlブロス/mlの反応液による処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。また、コントロールも同様に、0.5mlブロス/mlの反応液による処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。

実施例C 6：変異型エンドグルカナーゼRCEIIの発現

実施例C 4において、酵母において発現させたエンドグルカナーゼRCEIIはCMCアーゼ活性は示すものの、リヨセル毛羽除去活性は示さなかった。また、実施例C4(2)において測定された分子量は、予想される分子量より大きいものであった。これは、RCE Iの場合と同様に、アスパラギン結合型(Asn型)糖鎖の過剰付加によるものと考えられた。そこで、リヨセル毛羽除去活性を示すエンドグルカナーゼRCEIIを酵母において発現させるため、Asn型糖鎖認識部位のアミノ酸を置換した変異型エンドグルカナーゼRCEII遺伝子を作成した。

(1) RCEII遺伝子への部位特異的変異導入

RCEII遺伝子には、Asn型糖鎖の認識部位 Asn-X-Ser/Thr配列が5カ所あり、配列番号3のアミノ酸配列上のそれぞれ 45番目、92番目、119番目、122番目、および158番目の位置のアスパラギン残基に糖鎖が結合すると考えられた。Asn型糖鎖の付加されない変異型エンドグルカナーゼRCEIIを酵母において発現させるために、RCEII遺伝子に部位特異的変異導入を行った。

部位特異的変異処理は、実施例B 7(1)の方法に従って行った。即ち、まず、下記に示す4種の合成オリゴヌクレオチド pIRII-S47A、pIRII-N92Q、pIRII-S121L: N122D、およびpIRII-N158Dを変異導入用プライマーとして作製し、5'末端を予めリン酸化した。

次に、プラスミドをpRCEII-Bglで大腸菌CJ236株を形質転換し、ヘルパーファージを用いてssDNAを得た。このssDNAとプライマーを前述キットを用いてアニーリング、ポリメラーゼ反応により、二本鎖化し、大腸菌JM109株に導入することで

変異DNAを得た。この変異導入プラスミドをpRCEII-AQLDDとした。

pIRII-S47A 5'-AACGGCAATAAGGCCTCTGAATGTAGC-3' (27mer) (配列番号 66)

pIRII-N92Q 5'-GAAAGCAATGGCCAGAAAACCTTCTGAAAG-3' (29mer) (配列番号 67)

pIRII-S121L:N122D 5'-GCTTCAAACCTCTCTAGACTCTAGCGGC-3' (27mer) (配列番号 68)

pIRII-N158D 5'-CGGTAAGGCCGACGTCAGTTCTCC-3' (24mer) (配列番号 69)

(2) 変異型エンドグルカナーゼRCEIIの酵母における発現

変異型エンドグルカナーゼRCEII遺伝子の酵母における発現は、実施例B7(2)の方法に従って行った。即ち、実施例C6(1)において得られたプラスミドpRCEII-AQLDD IをBglIIで切断し、変異型エンドグルカナーゼRCEII遺伝子を回収した。これをプラスミドベクターpY283IのGAPプロモーターの下流のBamHIサイトに作動可能に連結し、プラスミドpYII-AQLDDを得た。このプラスミドを用いて酵母MS-161株を形質転換し、変異型エンドグルカナーゼRCEIIが発現した形質転換体を得た。

実施例C7：酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼRCEIIの評価

(1) 変異型RCEIIが発現した酵母の培養

実施例C6において得られたプラスミドpYII-AQLDDによる酵母の形質転換体を、実施例B8(1)と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

(2) SDS-PAGEによる分子量の測定

実施例C7(1)において得られた粗酵素液をSDS-PAGEに供したところ、分子量が約45kDのスメアなバンドとして検出された。

(3) 酵母で発現させた変異型RCEIIの評価 (CMCアーゼ活性)

実施例C7(1)において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCEII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

	CMCアーゼ (U/ml)
変異型 RCEII 遺伝子 組み換え 株	0.210
コントロール	0.000

(4) 酵母で発現させた変異型RCEIIのリヨセルの毛羽除去の評価

実施例C 7 (1) において得られた粗酵素液を用いて、実施例A 4と同様にpH 6、55℃におけるリヨセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCEII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果、変異型RCEII遺伝子組み換え株の0.2 mlプロス/mlの反応液で処理を行った結果、60%の毛羽が除去されていた。一方、コントロールは0.5 mlプロス/mlの反応液で処理を行ったが、まったく毛羽が除去されていなかった。

以上より、RCE Iと同様に、RCEIIを酵母においてリヨセル毛羽除去活性を示すように発現させるためには、Asn型糖鎖認識部位に糖鎖が付加されないようにアミノ酸を置換する必要があることが確かめられた。また、毛羽を完全に除去するために必要なタンパク質の量をSDS-PAGE後の染色の程度で測定した結果、実施例A 1の方法により精製したエンドグルカナーゼRCE Iと、酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼRCEIIとにおいてほぼ同等であった。

実施例C 8 : エンドグルカナーゼRCEIII遺伝子のクローニング

(1) ゲノムDNA ライブラリー (RCEIII遺伝子クローニング用) の作製

リゾプス・オリゼーのゲノムDNAをSac Iにより消化し、アガロースLEを用いた0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約10kbpの大きさのDNA断片を定法に従い、抽出し、精製した。このDNA断片を、Lambda DASH IIベクターに連結し、実施例B 4と同様にパッケージングを行い、得られたファージを大腸XL1-Blue MRA株に感染させた。この方法により得られた 1×10^6 個のファージライブラリーを用いて RCEIII遺伝子のクローニングを行った。

(2) RCEIII遺伝子のクローニング

実施例C 8 (1) で得られたライブラリーと、実施例B 3で得られた長鎖プローブを用いて、プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、実施例B 5と同様の条件にて行い、2個のファージクローンを得た。

得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRA株に感染させ、実施例B 5 (2) の方法に従ってDNAを調製した。このDNAを複数の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲ

ル電気泳動に供した後、実施例B 5 (3)の方法に従って、ナイロンメンブランにうつしとり、ハイブリダイゼーションした。その結果、2種のファージDNAにおいて、ゲノムDNAと同一のサイズの共通のバンドが検出され、特にSac Iの切断により約10kbp、BamH Iの切断により約2kbpの大きさの一本のバンドを示した。そこで、BamH Iによる切断で得られた約2kbpのバンドを回収し、プラスミドpUC118のBamH Iサイトにサブクローニングを行った。得られたプラスミドをpRCEIII-Bamとした。

実施例C 9：エンドグルカナーゼRCEIII遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列の決定は、実施例B 3 (3)と同様に行った。即ち、テンプレートDNAとして実施例C 8において得られたプラスミドpRCEIII-Bamを用い、プライマーとして、キット添付のリバースプライマーおよびFITC標識シーケンシングプライマーRCE-06を用いて反応を行って解析した。得られた結果から、新たなFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、pRCEIII-Bamに対して反応させ、更に解読を進めた。この手法を更に繰り返すことにより、RCEIIIの塩基配列を決定した。作製したFITC標識シーケンシングプライマーは以下の通りであった。

- RCEIII-01: 5'-TACAGGAGCCAACAGGGGAGGTG-3' (23mer) (配列番号70)
RCEIII-02: 5'-TTCACAGCAGGTAGGTCCATTCC-3' (23mer) (配列番号71)
RCEIII-03: 5'-CCTACGGTTTCGCGCTGCTTCC-3' (23mer) (配列番号72)
RCEIII-04: 5'-TAGATACCAACACCACCACCGGG-3' (23mer) (配列番号73)
RCEIII-05: 5'-TGAAGTTCCTTACCATTGCCTCC-3' (23mer) (配列番号74)
RCEIII-06: 5'-TGGTGAAACCACTCGCTACTGGG-3' (23mer) (配列番号75)
RCEIII-07: 5'-TTCTGCCTCTGACTGTTCTAACC-3' (23mer) (配列番号76)
RCEIII-08: 5'-AATAGAGTTACTCTATACGATAG-3' (23mer) (配列番号77)
RCEIII-09: 5'-CACCACCAGAGACAGCGGAGTAG-3' (23mer) (配列番号78)
RCEIII-10: 5'-TGC GTTGATTATCCTGACAATCC-3' (23mer) (配列番号79)

実施例C 10：エンドグルカナーゼRCEIII遺伝子の発現

(1) RCEIII遺伝子への部位特異的変異導入

RCEIII遺伝子の開始コドンのすぐ上流および終止コドンのすぐ下流にBamH Iサイトを以下のようにPCR法により導入した。まず、下記に示される合成オリゴヌク

レオチド pIIIC-Bam 1およびpIIIC-Bam 2を変異導入用プライマーとして新たに作製した。先に実施例C 8において得られたプラスミドpRCEIII-Bamをテンプレートとして、pIIIC-Bam 1およびpIIIC-Bam 2を用いてPCRを行い、変異DNAを得た。この変異DNAをBamH Iにより切断し、得られたDNA断片を回収し、プラスミド pUC118のBamH Iサイトにサブクローニングを行った。得られた変異導入プラスミドをpRCEIII-Bam 2とした。

pIIIC-Bam 1: 5'-GCGGATCCATGAAGTTCCTTACCATTGCC -3' (29mer) (配列番号 80)

pIIIC-Bam 2: 5'-GCGGATCCTTATTTTCTTGAACAGCCAGA -3' (29mer) (配列番号 81)

RCEIII遺伝子には、Asn型糖鎖の認識部位 Asn-X-Ser/Thr配列が4カ所あり、配列番号5のアミノ酸配列上のそれぞれ 44番目、49番目、121番目、および171番目の位置のアスパラギン残基に糖鎖が結合すると考えられた。そこで、酵母においてリヨセル毛羽除去活性を示すように発現させるために、44番目のAsn型糖鎖認識部位に糖鎖を付加されないようにアミノ酸を置換したものと、44番目と121番目の両方のAsn型糖鎖認識部位に糖鎖を付加されないようにアミノ酸を置換したものの2種の変異型RCEIII遺伝子の作製を行った。

部位特異的変異処理は実施例B 7 (1)の方法に従って行った。即ち、まず、下記に示す2種の合成オリゴヌクレオチドpIRIII-N44D、およびpIRIII-N121Kを変異導入用プライマーとして作製し、5'末端を予めリン酸化した。次に、プラスミドをpRCEIII-Bam 2で大腸菌CJ236株を形質転換し、ヘルパーファージを用いて ssDNA を得た。このssDNAとプライマーを前述キットを用いてアニーリング、ポリメラーゼ反応により、二本鎖化し、大腸菌JM109株に導入することで変異DNAを得た。ここで、44番目のアミノ酸のみが置換された変異導入プラスミドを pRCEIII-Dとし、44番目と121番目のアミノ酸の両方が置換された変異導入プラスミドを pRCEIII-DKとした。

pIRIII-N44D: 5'-GTGGAGGTGAGATCTTCATTGGGAAC-3' (26mer) (配列番号 82)

pIRIII-N121K: 5'-CAGCGGAGTACTTTGTAGAAGCAG-3' (24mer) (配列番号 83)

(2) 変異型エンドグルカナーゼRCEIIIの酵母における発現

変異型RCEIII遺伝子の酵母における発現を実施例B 7 (2)の方法に従って行った。即ち、上記(1)において得られた2種のプラスミドpRCEIII-D、pRCEIII

I-DKをそれぞれBamH Iで切断し、変異型RCEIII遺伝子を回収した。これらを、プラスミドベクターpY283I のGAPプロモーターの下流のBamH Iサイトに作動可能に連結し、2種のプラスミドpYIII-D、pYIII-DKを得た。これらプラスミドを用いて酵母MS-161株を形質転換し、変異型エンドグルカナーゼRCEIIIが発現した形質転換体を得た。

実施例C 1 1：酵母において発現した変異型エンドグルカナーゼRCEIIIの評価

(1) 変異型RCEIIIが発現した酵母の培養

実施例C 1 0において得られた2種のプラスミドpYIII-D、pYIII-DKによる酵母の形質転換体を、実施例B 8 (1) と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

(2) 酵母で発現させた変異型RCEIIIの評価 (CMCアーゼ活性)

実施例C 1 1 (1) において得られたpYIII-DKによる酵母の形質転換体の粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCEIII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

	CMCアーゼ (U/ml)
変異型RCEIII遺伝子組み換え株	0.472
コントロール	0.000

(3) 酵母で発現させた変異型RCEIIIのリヨセルの毛羽除去の評価

実施例C 1 1 (1) において得られたpYIII-DとpYIII-DKによる酵母の形質転換体2種の粗酵素液を透析した後、実施例A 4と同様にpH6、55℃におけるリヨセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCEIII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果、変異型RCEIII遺伝子組み換え株 (pYIII-D形質転換株) は0.2mlブロス/mlの反応液による処理により60%の毛羽が除去され、変異型RCEIII遺伝子組み換え株 (pYIII-DK形質転換株) は0.2mlブロス/mlの反応液による処理により80%

の毛羽が除去された。一方、コントロールは0.5mlブロス/mlの反応液で処理を行ったが、まったく毛羽が除去されていなかった。この結果より、セルロースバインディングドメインに最も近傍にあるAsn型糖鎖認識部位だけに糖鎖を付加されないようにアミノ酸を置換したものでも、リヨセルの毛羽除去活性を示すようになることが示唆された。

実施例 D 1 : エンドグルカナーゼRCE I遺伝子のフミコーラ・インソレンスにおける発現 (I)

(1) RCE I 遺伝子への部位特異的変異導入

RCE I 遺伝子の開始コドンのすぐ上流の配列を、フミコーラ・インソレンスにおける発現に適するように PCR法を用いて変異導入を行った。まず、下記に示される合成オリゴヌクレオチドpRIN-Bglを変異導入用プライマーとして新たに作製した。先に実施例B7 (1) において得られたプラスミド pRCE I -Bglをテンプレートとして、pRIN-Bglおよび、実施例B7 (1) において得られた合成オリゴヌクレオチド pIC-Bglを用いてPCRを行い、増幅した約1 kbの断片をpT7ブルー T ベクターにサブクローンした。得られた変異導入プラスミドをpHRCE I -Bgl-11とした。

尚、変異導入の際に作製したオリゴヌクレオチドプライマーの配列を以下に示す。
pRIN-Bgl : 5'-GGGAGATCTTGGGACAAGATGAAGTTTATTACTATTG-3' (37mer) (配列番号 84)

(2) プラスミド pJRID01の作製

a) プラスミド pM21-m-A1の作製

フミコーラ・インソレンスにおけるRCE I遺伝子の発現ベクター pJRID15の構築は、以下の様にして行った。まず、W098/03667 (PCT/JP97/02560) に従って得られるプラスミド pM21 に、合成オリゴヌクレオチドpMN-Bamを用いて部位特異的変異導入を行った。得られた変異導入プラスミド を pM21-m-A1とした。

尚、変異導入の際に作製したオリゴヌクレオチドプライマーの配列を以下に示す。
pMN-Bam : 5'-GGTCAAACAAGTCTGTGCGGATCCTGGGACAAGATGGCCAAGTTCTTCCTTAC-3' (53mer) (配列番号 85)

b) プラスミド pJD01の作製

まず、プラスミド pM21-m-A1を Hind III および BamH I によって消化し、約1 kbp の DNA 断片を回収した。次に、W098/03667に従って得られるプラスミド pMKD01を Hind III および BamH I によって消化し、約7 kbp の DNA 断片を回収した。最後にこれらの DNA 断片を連結し、得られたプラスミドを pJD01 とした。

c) プラスミド pJRID01の作製

プラスミド pJD01をBamH Iによって消化した後、アルカリホスファターゼ（宝酒造社製）により脱リン酸化した。次に前述（1）で得られたプラスミド pHRCE I-Bgl-11を BamH I によって消化し、約 1 kbp の DNA 断片を回収した。そして、これらを作動可能に連結し、得られたプラスミドを pJRID01 とした。

（3）プラスミド pJRID01 によるフミコーラ・インソレンスの形質転換
フミコーラ・インソレンス MN200-1 を W098/03667に記載の方法に従って、プラスミド pJRID01で形質転換し、ハイグロマイシン耐性を示す株を 50 株選抜した。

実施例 D 2：エンドグルカナーゼ RCE I遺伝子のフミコーラ・インソレンスにおける発現（II）

（1）プラスミド pJRID01による形質転換体の培養及び SDS-PAGE による評価
プラスミド pJRID01による形質転換体 50 株を W098/03667 に記載の方法に従って、(N) 培地で、37℃、4日間培養した。得られた培養上清を SDS-PAGE により解析したが、親株と比較して増加しているタンパク質バンドは検出されなかった。

（2）プラスミド pJRID01による形質転換体のリヨセル毛羽除去活性による評価
前述（1）において得られたプラスミド pJRID01 による形質転換体 50 株の培養上清を用いてリヨセル毛羽除去活性を測定した。方法は、実施例 A 4に従い、pH 6、55℃ において測定した。その結果、形質転換体は、いずれも非形質転換体である親株とほぼ同等のリヨセル毛羽除去活性しか示さなかった。

実施例 D 3：コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I遺伝子のフミコーラ・インソレンスにおける発現（I）

実施例 D2 の結果より、リゾプス・オリゼー由来のエンドグルカナーゼ RCE I遺伝子は、フミコーラ・インソレンスにおいてほとんど発現しなかった。これは、接合菌類に属するリゾプス由来の遺伝子のコドン使用が、不完全菌類に属するフミコーラ由来の遺伝子と大きく異なるためだと考えられた。図3は、エンドグルカ

ナーゼ RCE I 遺伝子のコドン使用を示したものであるが、RCE I は、コドンの3番目の文字として A や T を比較的多く使用している。これに対してフミコーラ由来のセルラーゼ遺伝子、NCE 1 (特開平8-56663号に記載)、NCE 2 (特開平8-126492号に記載) 及び NCE 4 (W098/03640号に記載) は、コドンの3番目の文字として G や C を多く使用する (図4~図6)。従って、リゾプス由来の RCE I 遺伝子をフミコーラにおいて発現させるためには、コドン使用をフミコーラ型に最適化する (より具体的には、コドンの3番目の文字として A や T が用いられている場合、コードするアミノ酸を変えない範囲でこれを G や C に書き換える) 必要があると考えられた。さらに、目的遺伝子の転写産物である mRNA の安定性を向上させるために、コドンの3番目の文字を単に G や C に書き換えるだけでなく、イントロン認識配列 (より具体的には、GTAGN、GTATN、GTAAN、GTACGN、GTGTN、GCACGN、GTTTCGN等のDNA配列) を含まないような配列を選択する必要があると考えられた。そこで、これらの条件をみたすようなコドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子を設計し、後述のようにこれを全合成した。

(1) コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子の全合成

a) プラスミド p12-BI の作製

まず、以下の配列を有する2本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

RCE I-01 :

5'-GGGGGATCCTGGGACAAGATGAAGTTCATCACTATCGCCTCCTCCGCCCTCCTTGCCCTCGCCCTTGGC
ACTGAGATGGCCTCCGCCGCTGAGTGCTCCAAGCTCTACGGCCAGTGCGGCGGAAAGAACTGG-3' (132mer)
(配列番号 86)

RCE I-02 :

5'-GGCCGACTCGCTCGACTTGTTTCCCGAGGAGCCGCTCGGCAGGCACTGGCTGTAGTAGTCATTTCGAGAC
CTTGCAAGTTCGAGCCGCTCTCGCAGCAGGTGGGGCCGTTCCAGTTCTTTCCGCCGCACTGGCCGTAG-3'
(136mer) (配列番号 87)

次に、これらを用いてPCR反応を行った。PCR反応は、LA PCRキット (宝酒造社製) を使用した。RCE I-01、RCE I-02 各1 μ Mに、dNTP、バッファーを加え、94℃ 10分間インキュベートした後、5分間氷冷した。その後、LA Taq ポリメラーゼを加え、94℃ 30秒間、55℃ 30秒間、72℃ 1分45秒間のサイクル反応を 20 回繰り返

した後、72℃で10分間インキュベートした。増幅した約 200bpのDNAを実施例 B3の方法に従い、pT7ブルーTベクターにサブクローンした。得られたプラスミドを p12-BIとした。

b) プラスミド p123-6の作製

まず、以下の配列を有する合成オリゴヌクレオチドを作製した。

RCE I-P335-Xho-C :

5'-GGGCTCGAGTTGGACGGAGTCGAAGCCTTGGCGACGGTCGTGGTCTTCTTGGCGGGAGCGGTCGTAGTCTTCTTGTGAGCGGCGGTCGTGGTCTTCTTGTGGGCAGCGGTCGTGGTCTTCTTGTGGGCCGACTCGCTCGACTGTTTCCC-3' (150mer) (配列番号 8 8)

次に、実施例 D3 (1) a)の方法に従いPCR反応を行った。テンプレート DNAとしてプラスミド p12-BIを1 μ g、プライマーとしてRCE I-01、RCE I-P335-Xho-Cを各1 μ M用いた。実施例 D3 (1) a)と同様の条件でPCR反応を行ったところ、約300 bpのDNAが増幅した。この約300bp のDNAをpT7 ブルーTベクターにサブクローンし、得られたプラスミドを p123-6とした。

c) プラスミド p34-6の作製

まず、以下の配列を有する2本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

RCE I-03 :

5'-GGAAACAAGTCGAGCGAGTCGGCCCACAAGAAGACCACGACCGCTGCCCACAAGAAGACCACGACCGCCGCTCACAAGAAGACTACGACCGCTCCCGCCAAGAAGACCACGACCGCTCGCCAAGGCTTCGACTCCGTCCAACTCGAGCAGCTCGTCCTC-3' (158mer) (配列番号 8 9)

RCE I-04 :

5'-GTCCTTGTTGCAGGACTTGACAGGCGAGCTGACGTTAGCCTTGCCGGGCCACGAGCACGAAGCCTTGCA GCAGTCCCAGTAGCGGGTAGTGACGCCGTTGCCGCTAGCGCCACCGCTGACAGCGCTGTACTTTCCCGAGGACGAGCTGCTCGAGTTGGAC-3' (160mer) (配列番号 9 0)

次に、これらを用いてPCR反応を行った。実施例 D3 (1) a)の方法に従い、RCE I-03、RCE I-04 各1 μ Mに、dNTP、バッファーを加え、同様の条件で反応を行った。増幅した約300 bp のDNAをpT7ブルーTベクターにサブクローンし、得られたプラスミドを p34-6とした。

d) プラスミド p3456-18の作製

まず、以下の配列を有する2本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

RCE I-P34-6-Nco-C :

5'-AGCCCATGGCTGGTTGTCGTTGCACATGTAGGAGTTGCCGCCGTTGCAGCCGGACTGGGCGTTGGAGTC
GCTAAGAGCGGTGACGCCGTCCTTGTTCAGGACTTGACAGGCGAGCTGAC-3' (120mer) (配列番号 9 1)

RCE I-P34-6-Sac-C :

5'-GGTGAGCTCGAAGCAGGAGCAGCACCAGCGGCTCTCGCCACCGCCGCTAATGGCAGCGGCAGCGAAACC
GTAAGCAAGGTTGTCGTTGACAGCCCATGGCTGGTTGTCGTTGCACATG-3' (118mer) (配列番号 9 2)

次に、実施例 D3 (1) a)の方法に従いPCR反応を行った。テンプレートDNAとしてプラスミド p34-6を1 μ g、プライマーとしてRCE I-03、RCE I-P34-6-Nco-Cを各1 μ M用いた。実施例 D3 (1) a)と同様の条件でPCR反応を行ったところ、約400 bpのDNAが増幅した。この約400 bpのDNA断片を前述セファグラスバンドプレップキットを用いて回収し、更にこのDNA断片をテンプレートとしてPCR反応を行った。即ち、テンプレート DNA として先に回収した約400 bpのDNA断片を約20ng、プライマーとしてRCE I-03、RCE I-P34-6-Sac-Cを各1 μ M用い、実施例 D3 (1) a)と同様の条件でPCR反応を行ったところ、約500 bpのDNAが増幅した。増幅した約500 bpのDNAをpT7ブルーTベクターにサブクローンし、得られたプラスミドをp3456-18とした。

e) プラスミド p78-2の作製

まず、以下の配列を有する2本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

RCE I-07 :

5'-GTGCCCACCTTCGATCTCCAGATGCCCGGCGGCGGCGTCCGCATCTTCAACGGATGCTCGTCCCAGTGGG
GCGCTCCCAACGACGGCTGGGGCTCGCGCTACGGCGGCATCAGCTCCGCCAGCGACTGCTCGTCCCTCCCCA
GCGCCCTCCAGGC-3' (154mer) (配列番号 9 3)

RCE I-08 :

5'-GGGGGGATCCTGCGTTTACTTGCGGAGCATCCGGTCTTAGCGGTGATCTCCTTGGGGCAGGTGACCTC
CTTGTAGGTCATGGACGGGTTGTCGGCGTTCTTGAACCAGTTGAAGCGCCACTTGCAGCCGGCCTGGAGGGC
GCTGGGGAGGGAC-3' (154mer) (配列番号 9 4)

次に、これらを用いてPCR反応を行った。実施例 D3 (1) a)の方法に従い、RCE I-07、RCE I-08 各1 μ Mに、dNTP、バッファーを加え、同様の条件で反応を行った。増幅した約300 bp のDNAをpT7ブルーTベクターにサブクローンし、得られたプラスミドをp78-2とした。

f) プラスミド p678-8の作製

まず、以下の配列を有する2本の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

RCE I-P78-2-SacN :

5'-GGGGAGCTCACCTTCACCTCCACCAGCGTTGCTGGCAAGAAGATGGTCGTCCAGGTCACCAACACTGGC
GGTGACCTTGGCAGCTCGACCGGTGCCCACTTCGATCTCCAGATGCCC-3' (117mer) (配列番号 9
5)

RCE I-H-C : 5'-GGGGGGATCCTGCGTTTACTTGCGCGAGCATC-3' (32mer) (配列番号 9 6)

次に、実施例 D3 (1) a)の方法に従いPCR反応を行った。テンプレートDNAとしてプラスミドp78-2を1 μ g、プライマーとしてRCE I-P78-2-SacN、RCE I-H-Cを各1 μ M用いた。実施例 D3 (1) a)と同様の条件で PCR反応を行ったところ、約400 bpのDNAが増幅した。この約400 bpのDNAをpT7ブルーTベクターにサブクローンし、得られたプラスミドを p678-8とした。

g) プラスミド p18-の作製

まず、プラスミド p3456-18を Xho I および Sac I によって消化し、約300 bpのDNA断片を回収した。次に、プラスミド p678-8をSac I および Kpn I によって消化し、約400 bp のDNA断片を回収した。これらのDNA断片をDNAライゲーションキットを用いて連結し、さらに連結混合物をアガロースゲル電気泳動に供し、約700 bpのDNA断片を回収した。このDNA断片を、予め Xho I および Kpn I によって消化したプラスミド p123-6に連結し、プラスミド p18-を得た。

(2) コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I遺伝子の塩基配列の解析

塩基配列の解析は、実施例 B3 (3)と同様に行った。即ち、テンプレートDNAとして実施例 D3 (1) g)において得られたプラスミド p18-1を用い、プライマーとして新たに作製した下記の配列を有する RCE-H01~H08 のFITC標識シーケンシングプライマーを用いて反応を行い、解析した。

その結果、プラスミド p18-1上のコドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I遺伝子

の全塩基配列を解析できた。コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子は、配列番号 1 3 の塩基配列を有し、本配列より推定されるアミノ酸配列は、配列番号 1 に記載のエンドグルカナーゼ RCE I のアミノ酸配列と完全に一致した。

RCE-H01: 5'-TCAGCGGTGGCGCTAGCGGCAAC-3' (23mer) (配列番号 9 7)

RCE-H02: 5'-CTAATGGCAGCGGCAGCGAAACC -3' (23mer) (配列番号 9 8)

RCE-H03: 5'-CCGGTGCCCACTTCGATCTCCAG-3' (23mer) (配列番号 9 9)

RCE-H04: 5'-TCTTTCCGCCGCACTGTCCGTAG-3' (23mer) (配列番号 1 0 0)

RCE-H05: 5'-ACGACAACCAGCCATGGGCTGTC-3' (23mer) (配列番号 1 0 1)

RCE-H06: 5'-TCTCGAATGACTACTACAGCCAG-3' (23mer) (配列番号 1 0 2)

RCE-H07: 5'-CCCACTGGGACGAGCATCCGTTG-3' (23mer) (配列番号 1 0 3)

RCE-H08: 5'-CGAGCTGCTCGAGTTGGACGGAG-3' (23mer) (配列番号 1 0 4)

(3) プラスミド pJI4D01 の作製

実施例 D1 (1) で得られたプラスミド pJD01 を BamH I によって消化した後、アルカリホスファターゼにより脱リン酸化した。次に、実施例 D3 (1) g) で得られたプラスミド p p18-1 を BamH I によって消化し、約 1 kbp の DNA 断片を回収した。そして、これらを作動可能に連結し、得られたプラスミドを pJI4D01 とした。

(4) プラスミド pJI4D01 によるフミコーラ・インソレンスの形質転換

フミコーラ・インソレンス MN200-1 を W098/03667 に記載の方法に従って、プラスミド pJI4D01 で形質転換し、ハイグロマイシン耐性を示す株を 50 株選抜した。

実施例 D4 : コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子のフミコーラ・インソレンスにおける発現 (II)

(1) プラスミド pJI4D01 による形質転換体の培養及び SDS-PAGE による評価
プラスミド pJI4D01 による形質転換体 50 株を W098/03667 に記載の方法に従って、(N) 培地で、37℃、4日間培養した。得られた培養上清を SDS-PAGE により解析したところ、プラスミド pJI4D01 による形質転換体のうち 5 株において、エンドグルカナーゼ RCE I と推定される分子量約 40kD のタンパク質バンドが検出された。

(2) プラスミド pJI4D01 による形質転換体のリヨセル毛羽除去活性による評価
前述 (1) において、SDS-PAGE で分子量約 40kD のタンパク質の発現が確認された

5株のうち、特に発現が顕著な2株（1-18、2-15株）の培養上清を用いて、リヨセル毛羽除去活性を測定した。コントロールとして非形質転換体である親株由来の培養上清液を用いた。方法は、実施例A 4に従い、pH 6、55℃の反応条件で各種培養上清液でリヨセルの毛羽除去処理を行なうことにより、形成された毛羽が完全に除去されるのに要する培養上清液量を求めた。結果を下記の表3に示した。

第 3 表

リヨセル毛羽除去に必要な 培養液上清液量 (ml)	
フミコーラ・インソレンス MN200-1 (親株)	8.0 ml 添加しても約 60% しか毛羽除去されなかった。
フミコーラ・インソレンス pJI4D01 (1-18株)	2.0
フミコーラ・インソレンス pJI4D01 (2-15株)	0.1

実施例 D 5 : コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子のフミコーラ・インソレンスにおける発現 (III)

(1) プラスミド pJI4D01による形質転換株のFPLCによる評価

実施例 D4 において得られたプラスミド pJI4D01 による形質転換株 (2-15株) と親株から得られた培養上清を、それぞれFPLCシステム (ファルマシアバイオテク社製) を用いてカラムクロマトグラフィーに供した (カラム: RESOURCETM RPC 3m l、0.1%TFAを含む5%~60%アセトニトリルグラジエント)。その結果、プラスミド pJI4D01による形質転換株 (2-15株) より得られた培養上清中に、親株にない新規のピークが検出された。

(2) 組み換えエンドグルカナーゼ RCE I のN末端アミノ酸残基の同定

前述、実施例 D4、D5 より、エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子のコドン最適化の結果、フミコーラ・インソレンスにおいて、組み換えエンドグルカナーゼ RCE I が大量発現したと考えられた。そこで、大量発現したタンパク質がコドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子由来であることを確認するために、このタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。

まず、実施例 D5 (1) に従い、プラスミド pJI4D01による形質転換株 (2-15株)

をFPLCシステムに供し、得られた新規のピークを分取した。次に、本ピークを遠心濃縮し、SDS-PAGE（8%ゲル使用）に供した。タンパク質をマルチフォーII電気泳動装置（ファルマシア社）を用いて、タンパク質をPVDF膜（ミリポア社）に電氣的にうつしとり、クマシーブリリアントブルーR-250で染色した後、脱色し、水で洗浄し、風乾した。その後、目的のバンド（40KD）を切り出し、これをプロテインシーケンサーModel 492（パーキンエルマー社）に供し、N末端側アミノ酸配列を16残基決定した。得られた配列を以下に示す。

N末端アミノ酸配列：Ala-Glu-(Cys)-Ser-Lys-Leu-Tyr-Gly-Gln-(Cys)-Gly-Gly-Lys-Asn-Trp-Asn（16残基）（配列番号105）

このN末端側アミノ酸配列は、プラスミド pJI4D01 の塩基配列から推定されるエンドグルカナーゼ RCE I タンパク質のアミノ酸配列と一致した。

従って、エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子のコドン最適化の結果、フミコーラ・インソレンスにおいて、組み換えエンドグルカナーゼ RCE I が大量発現したことが確認された。

実施例 D 6：コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子のアスペルギルス・ニガーにおける発現 (I)

(I) アスペルギルス・ニガーFERM P-5886株からのniaD変異株の取得

アスペルギルス・ニガーFERM P-5886株の胞子を、6%の塩素酸塩を含む最少寒天培地（0.2%グルタミン酸ナトリウム、0.1%リン酸水素二カリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.05%塩化カリウム、0.001%硫酸鉄、3%ショ糖、1.5%寒天、pH5.5）に塗布し、30℃にて保温した。約5日間培養した後、コロニーを形成したものを塩素酸耐性株とした。これら耐性株をグルタミン酸塩、硝酸塩または亜硝酸塩をそれぞれ単一の窒素源として含む最少培地に植菌し、窒素源要求性の検討を行った。その結果、グルタミン酸ナトリウム、亜硝酸塩を単一の窒素源として含む最少培地では生育できるが、硝酸塩では生育できない塩素酸耐性株が存在し、これらをniaD変異株候補とした。

niaD変異株候補の内の3株について菌体内のニト্রেートレダクターゼ（硝酸還元酵素=niaD遺伝子産物）活性の測定を行った。これら3株を液体培地（0.2%グルタミン酸ナトリウム、0.1%リン酸水素二カリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.05%

塩化カリウム、0.001%硫酸鉄、3%ショ糖）で30℃、60時間振とう培養して得られた湿菌体0.2gを2mlの50mMリン酸ナトリウムバッファー（pH7.5）に懸濁し、ホモジナイズ・超音波により破碎し、不溶画分を遠心によって除いた上清をサンプルとした。サンプル液50 μ lに対し蒸留水1000 μ l、0.2Mリン酸ナトリウム溶液（pH7.5）750 μ l、0.04mg/mlFAD100 μ l、2mg/mlNADPH100 μ l、22.5mg/ml硝酸ナトリウム1000 μ lを加え、37℃で反応させた。反応させたサンプルに対し、1%スルファニルアミド（3N塩酸にて溶解）500 μ l、0.02%N-1-ナフチルエチレンジアミン500 μ lを加えて発色させ、A540を測定することによりニト্রেートレダクターゼ活性の検出を試みたが、これら3株にはニト্রেートレダクターゼ活性は検出されなかった。そこで、これら3株をniaD変異株と結論し、この内の1株をNIA5292株と命名し、以下の実験に供した。

（2）アスペルギルス・ニガー FERM P-5886株のniaD遺伝子の取得

a) プローブの作製

アスペルギルス・ニガー NRRL4337株をYPD液体培地（1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース）で培養した。得られた菌体より公知の方法（特願平8-53522）によって抽出した全DNAを鋳型にし、Unkles, S. E., et al., Gene 111, 149-155（1992）に記載のアスペルギルス・ニガーのniaD遺伝子の塩基配列をもとに作製した、配列番号106および107の合成DNAプライマーをプライマーにしてPCR法によるDNAの増幅を行った。反応液100 μ lあたり染色体DNA0.5 μ g、プライマー各100pmol、及びTaqDNAポリメラーゼ2.5U（ニッポンジーン社）を含み、94℃1分間、50℃2分間、72℃2分間の温度条件で25サイクル反応させたところ、約800bpのDNA断片が特異的に増幅された。このDNA断片の塩基配列を決定をしたところ、既に報告されているアスペルギルス・ニガーのniaD遺伝子の塩基配列と100%一致し、このDNA断片がniaD遺伝子に由来することが明らかとなった。そこでこの約800bpのDNA断片をプローブとして用いることとした。

NIA-CN: 5'- GACTGACCGGTGTTTCATCC-3'（19mer）（配列番号106）

NIA-CC: 5'- CTCGGTTGTCATAGATGTGG-3'（20mer）（配列番号107）

b) アスペルギルス・ニガーの染色体DNAのサザン解析

アスペルギルス・ニガー FERM P-5886株をYPD液体培地（1%酵母エキス、2%

ポリペプトン、2%グルコース)で培養した。得られた菌体より公知の方法(特願平8-53522)によって抽出した全DNAを制限酵素(HindIII、EcoRI、BamHI、SacI、SalI、XbaI)で完全消化した後、アガロースゲル電気泳動により分画し、モレキュラー・クローニング(Cold Spring Harbour、1982年)に記載の方法に従ってナイロン膜(Hybond-N⁺、アマシャム社)上にプロットした。このナイロン膜に対し、前出の800bpのDNA断片をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行った。なお、プローブの標識・シグナルの検出には、アマシャム社のECLダイレクトDNAラベリング・検出システムを用い、条件は添付のマニュアルに従った。その結果SalIで消化した際の約6.5kbpの位置等にシグナルが検出された。

c) niaD遺伝子の単離

アスペルギルス・ニガー FERM P-5886株の全DNAを制限酵素MboIで部分分解した後、アガロースゲル電気泳動により分画し、9-23kbp付近のDNA断片を定法により抽出、回収した。回収したDNA断片をλDASHIIのBamHIサイトに連結し、STRATAGENE社のGIGAPACK II Goldによりパッケージングを行い、大腸菌に感染させることによりライブラリーを作製した。

前出の800bpのDNA断片をプローブとして用い、アマシャム社のECLダイレクトDNAラベリング・検出システムを使用してブランクハイブリダイゼーションを行い、陽性クローンを得た。得られた陽性クローンについて2次スクリーニングを実施し、陽性クローンを純化した。

陽性クローンよりファージDNAを調製し、約6.5kbp SalI断片が挿入されていることを確認した。このDNAに対してサザン解析を行い、niaD遺伝子が含まれるより小さなDNA断片として、約4.8kbpのSacI断片を見出し、この断片の制限酵素地図を作製した。さらにこのSacI断片をプラスミドpUC118にサブクローン化した。得られたプラスミドをpniaD-Sacとした。このSacI断片を適宜制限酵素で小断片化した後にプラスミドpUC118にサブクローン化し、これを鋳型にして塩基配列を決定し、単離したDNA断片内におけるniaD遺伝子の位置を特定した。

(3) アスペルギルス・ニガーNIA5292株の形質転換

アスペルギルス・ニガーNIA5292株を液体培地(2%可溶性澱粉、1%ポリペプトン、0.2%酵母エキス、0.5%リン酸二水素ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム)

で28℃、24時間振とう培養した。菌体をガラスフィルターで集菌し、酵素溶液 (1 mg/ml β -グルクロニダーゼ (シグマ社)、5mg/ml ノボザイム 2 3 4 (ノボ・ノルディスク社)、10mMリン酸ナトリウム (pH5.8)、0.8M塩化カリウム) に懸濁して、30℃で穏やかに1.5時間加温した。プロトプラスト化した細胞をガラスフィルターでろ過し、通過画分を遠心により集菌してSTCバッファー (10mMトリス (pH7.5)、10mM塩化カルシウム、1.2Mソルビトール) で2回洗浄した後、STCバッファーに懸濁した。続いてプロトプラストとプラスミドDNAを混合して、氷上に20分間静置した後、さらにPEG液 (10mMトリス (pH7.5)、10mM塩化カルシウム、60%ポリエチレングリコール4000) を加えて氷上にもう20分間静置し、DNAをプロトプラスト内に導入した。プロトプラストはSTCバッファーにて数回洗浄した後、1.2Mソルビトールと0.8%アガーを含むツァペック培地 (0.2%硝酸ナトリウム、0.1%リン酸水素二カリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.05%塩化カリウム、0.001%硫酸第二鉄、3%ショ糖) に懸濁し、1.2Mソルビトールと1.5%アガーを含むツァペック寒天培地に重層して、30℃で培養した。約5日間培養した後、コロニーを形成したものを形質転換体として選択した。

実施例 D 7 : コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子のアスペルギルス・ニガーにおける発現 (II)

(1) プラスミドpSAEX11の作製

アスペルギルス・ニガーにおいて作動可能なアミラーゼプロモーターを有する発現ベクターを以下のようにして構築した。

a) プラスミドpAMYIの作製

まず、W097/00944号に従って得られるプラスミドpAMYを制限酵素EcoR I及びSal I で消化し、得られた約0.75kbのDNA断片を、同じくEcoR I、Sal I で消化したpUC119に連結した。得られたプラスミドをpAMYIとした。

b) プラスミドpAMYIへの部位特異的変異導入

アミラーゼ遺伝子の開始コドンのすぐ上流にBamH I サイトを部位特異的変異により導入した。部位特異的変異導入の方法は実施例B 7 (1) に従った。

まず、下記の合成オリゴヌクレオチドpAMBMを変異導入用プライマーとして新たに作製し、5'末端をリン酸化した。次に、プラスミドpAMYIを大腸菌CJ236株にて

一本鎖化した後、リン酸化したプライマーと反応させ、変異DNAを得た。この変異導入プラスミドをpAMY-Bamとした。

pAMB: 5'-CCCACAGAAGGGATCCATGATGGTCGC -3' (27mer) (配列番号 108)

c) プラスミドpSAEX11の作製

まず、プラスミドpAMY-Bamを制限酵素EcoR I及びBamH Iで消化し、得られた約0.6 kbのDNA断片を回収した。次に、Cullenらの報告(Cullen, D., Gene. 57, 21-26)に従って得られるプラスミドpDH25をEcoR I、BamH Iで消化し、得られた約4.7 kbのDNA断片を回収した。両者を連結し、得られたプラスミドをpSAEX11とした。

(2) プラスミドpANR22、pANH42の作製

リゾプス由来のエンドグルカナーゼ RCE I遺伝子及び、全合成によって作製されたコドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I遺伝子をアスペルギルス・ニガーにおいて発現させるために、発現ベクターpANR22、pANH42を構築した。

a) プラスミドpANR21、pANH41の作製

まず、リゾプス由来のエンドグルカナーゼ RCE I遺伝子断片として、プラスミドpHRCEI-Bgl-11を制限酵素Bgl IIで消化し、得られた約1kbのDNA断片を回収した。また、コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I遺伝子断片として、プラスミドpJ14D01をBamH Iで消化し、得られた約1kbのDNA断片を回収した。

次に、プラスミドpSAEX11をBamH Iで切断し、エンドグルカナーゼRCE I遺伝子のBgl II断片及びコドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I遺伝子のBamH I断片とそれぞれ連結した。得られたプラスミドをそれぞれpANR21、pANH41とした。

b) プラスミドpANR22、pANH42の作製

まず、プラスミドpANR21、pANH41を制限酵素XbaIで切断した、次に、実施例 D6記載のプラスミドpniaD-Sacを制限酵素XbaIで切断し、約4.8Kbpの断片を得た。この断片にはniaD遺伝子上流部の制限酵素SacIの認識部位の直後に存在する制限酵素XbaIの認識部位から、niaD遺伝子下流部の制限酵素SacIの認識部位の直後に存在するpUC118に由来する制限酵素XbaIの認識部位までが含まれている。この4.8Kbpの断片をプラスミドpANR21、pANH41のXbaIサイトにそれぞれ挿入した。得られたプラスミドをpANR22、pANH42とした。

実施例 D 8 : コドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子のアスペルギルス・ニガーにおける発現 (III)

(1) プラスミド pANR22、pANH42 によるアスペルギルス・ニガー NIA5292 株の形質転換

実施例 D6 記載の方法により、プラスミド pANR22 及び pANH42、及びコントロールとしてベクターのみによって、アスペルギルス・ニガー NIA5292 株を形質転換した。ツアベック寒天培地上の形質転換体をそれぞれ約 50 株を SMPN 液体培地 (3% Soluble starch, 0.7% Malt extract, 1% Polypeptone, 0.3% NaCl) にて 28℃ で 3 日間培養した。培養上清液は透析した後、実施例 A 4 に従い、pH 6、55℃ の反応条件でリヨセルの毛羽除去を行ない、毛羽除去の度合を調べた。結果を下記の表 4 に示した。プラスミド pANH42 による形質転換体の培養液はリヨセル毛羽除去活性を示したが、ベクターのみ、もしくはプラスミド pANR22 によって形質転換された株の培養液は全くリヨセル毛羽除去活性を示さなかった。

第 4 表

リヨセル毛羽除去度	
アスペルギルス・ニガー (ベクターのみ)	毛羽が全く除去されなかった
アスペルギルス・ニガー pANR22	毛羽が全く除去されなかった
アスペルギルス・ニガー pANH42	80% の毛羽が除去された

実施例 D 9 : リンカー領域の一部分を欠失させたコドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子のフミコーラ・インソレンスにおける発現

(1) プラスミド pJI4D01 内の RCE I 遺伝子部分のリンカーの一部 (配列番号 13 に記載の 331 番目の塩基である G から 405 番目の塩基である C まで) を PCR を用いることにより欠失させ、このプラスミドを pJI4D10 とした。

(2) プラスミド pJI4D10 による形質転換体の培養及び SDS-PAGE による評価
 プラスミド pJI4D10 による形質転換体 30 株を W098/03667 に記載の方法に従って、(N) 培地で、37℃、4 日間培養した。得られた培養上清を SDS-PAGE により解析したところ、プラスミド pJI4D10 による形質転換体のうち 5 株において、欠失 RCE I と推定される分子量約 30~35kD のタンパク質バンドが検出された。

(3) プラスミド pJI4D10による形質転換体のリヨセル毛羽除去活性による評価
 前述(2)において、SDS-PAGEで分子量約30~35kDのタンパク質の発現が確認された5株のうち、特に発現が顕著な1株(3-13株)の培養上清を用いて、リヨセル毛羽除去活性を測定した。コントロールとしてRCEIのリンカー領域の一部分を欠失させていない2-15株由来の培養上清液を用いた。方法は、実施例A4に従い、pH6、55℃の反応条件で各種培養上清液0.1mlでリヨセルの毛羽除去処理を行なうことにより、形成された毛羽の除去される度合いを調べた。結果を下記の第5表に示した。

第 5 表

リヨセル毛羽除去の 度合い
フミコーラ・インソレンス pJI4D01 (2-15株) 完全に毛羽が除去された
フミコーラ・インソレンス pJI4D10 (3-13株) 全く毛羽が除去されなかった

実施例E1：ムコール・サーシネロイデスにおけるRCEI遺伝子の相同体遺伝子の検索

ムコール・サーシネロイデスのゲノムDNA中のエンドグルカナーゼRCEI遺伝子の相同体遺伝子を検索するために、サザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。

まず、実施例B2に従って得られたムコール・サーシネロイデスのゲノムDNA約10μgを複数の制限酵素(EcoR I、BamH I、Hind III、Sac I、Xba I、Sal I等)で各々切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。これを実施例B5(3)に従って、メンブランにうつしとり、前述実施例と同一の条件にてRCEI遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。その結果、ムコール・サーシネロイデスのゲノムDNA上には、少なくとも1種類の相同な遺伝子が存在することが明らかになった。この遺伝子は、特にゲノムDNAをEcoR Iで切断した場合のハイブリダイゼーションにおいて、一本のバンドとして検出された。そのため、

約4.5kbp のバンドとして検出される遺伝子をMCEI遺伝子として、以降のクローニングを行った。

実施例 E 2 : エンドグルカナーゼMCEI遺伝子のクローニング

(1) ゲノムDNAライブラリー (MCEI遺伝子クローニング用) の作製

ムコール・サーシネロイデスのゲノムDNAをEcoR I により消化し、Seakem LE アガロースを用いた0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約3~6.5 kbpの大きさのDNA断片を定法に従い、抽出、精製した。このDNA断片をファージベクター、Lambda gt10ベクター (ストラタジーン社製) に連結し、実施例 B 4 と同様にパッケージングを行った。得られたファージを大腸菌NM514株に感染させた。この方法により得られた 1×10^4 個のファージライブラリーを用いてMCEI遺伝子のクローニングを行った。

(2) ゲノムDNAからのMCEI遺伝子のクローニング

実施例 E 2 (1) で得られたライブラリーと、RCEI遺伝子プローブを用いて、ブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、実施例 B 5 と同様の条件にて行い、6個のファージクローンを得た。

得られたファージを大腸菌NM514株に感染させ、実施例 B 5 (2) の方法に従って DNA を調製し、EcoR I で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。これを実施例 B 5 (3) の方法に従って、ナイロンメンブランにうつしとり、ハイブリダイゼーションした。その結果、6種のファージDNAにおいて、ゲノムDNAと同一のサイズの共通の約4.5kbpのバンドが検出された。このバンドを回収し、プラスミド pUC119のEcoR Iサイトにサブクローニングを行い、得られたプラスミドを pMCEI-Ecoとした。この約4.5kbpの塩基配列の決定は、実施例 B 3 (3) と同様に行い、解読された塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、一つの読み枠が、実施例 B 1 において示されたエンドグルカナーゼ MCEIのN末端アミノ酸配列と一致した。しかしながら、この配列にはイントロンが含まれていることが推察されたため、RT-PCRによりMCEI遺伝子のcDNAの単離を行なった。

(3) RT-PCRによるMCEI遺伝子のcDNAの単離と塩基配列決定

ムコール・サーシネロイデスを30mlの 液体培地 (3.0% コーンステープリカー、0.5% 酵母エキス (Difco社製)、2.4% ポテトデキストロースブロス (Difco社製)、

2% スクロース) で30℃、18時間培養し、ガラスフィルターによって菌体を集菌した。得られた各菌体を凍結乾燥し、スパーテルにて細かく破碎した。全RNAはIsogen (和光純薬工業社製) を用いて単離した。まず、菌体粉末にIsogen 5mlを入れ、30秒間Vortexし、50℃、で10分間保温した。その後、室温で5分間放置した。次に、0.8mlのクロロホルムを加えて、激しく振とうした。遠心後、水層を別の容器に移し、これに2mlの 4 M LiCl加えて混合し、-70℃で15分放置した。その後、遠心し、上清液を除いた後、沈殿を1.6mlの水で溶解し、次に1.6mlのイソプロパノールを加えて混合し、4℃、30分放置する。遠心後、上清液を除き、沈殿を75%エタノールで洗浄後、沈殿を1.6mlの水で溶解した。この液をエタノール沈殿し、沈殿を75%エタノールで洗浄後、乾燥し、0.4mlの水に溶解し、これを全RNAとした。

次に、mRNAの調製は、mRNA アイソレーションキット (Stratagene社製) を用いて行った。まず前記で調製した0.2mlの全RNAに10mlのエリ्यूションバッファーを加え、さらに5mlのオリゴdT溶液を加えた。上清液を除いた後、このオリゴdTをハイソルトバッファーで3回、ロウソルトバッファーで2回で洗浄の後、68℃に加温したエリ्यूションバッファーで溶出した。この溶液をエタノール沈殿し、沈殿を75%エタノールで洗浄後、乾燥し、15 μ lの水に溶解し、これをmRNA画分とした。

次に、RT-PCRによるmRNAからのMCEI遺伝子のcDNAの調整は、Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1を用いた。すなわち、前記において決定したゲノム由来のMCEI遺伝子配列から推定されるN末端およびC末端のプライマーとして以下の様な配列のオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、前に調整したmRNAのうち1 μ lを鋳型とし、MCEI遺伝子のcDNAのみをPCR法により増幅した。

MCEI-CN: 5'-GCCAATTCATGAAGTTCACCGTTGCTATT-3' (29mer) (配列番号109)

MCEI-CC: 5'-GCCAATTCCTTACTTTCTTTGCAACCTG-3' (28mer) (配列番号110)

RT-PCR反応は、以下の条件で行った。まず、C末端のプライマーを加えて、逆転写酵素によって、反応させた後、Taq ポリメラーゼ (リコンビナントTaq、宝酒造社製)、N末端のプライマーを加え、94℃1分間、50℃2分間、72℃2分間の反応条件を30回繰り返すことにより増幅した。増幅された断片は、アガロースゲル電気泳動の結果、約1.1kbpと1.0kbpの2断片であった。これをpUC118のEcoR Iサイ

トにサブクローニングし、それぞれの断片の塩基配列を実施例 B 3 (3) の方法に従い、決定した。この塩基配列とゲノムの塩基配列を比較し、イントロンを決定した。この解析の結果、ムコール・サーシネロイデスには N 末端側と C 末端側の一部の遺伝子配列が同一な 2 種のエンドグルカナーゼが発現していることが確かめられた。そこで、短い塩基配列 (約 1.0 kbp) にコードされるエンドグルカナーゼを MCEI、長い塩基配列 (約 1.1 kbp) にコードされるエンドグルカナーゼを MCEI I と命名した。

実施例 E 3 : エンドグルカナーゼ MCEI 遺伝子の発現

(1) MCEI 遺伝子への部位特異的変異導入

RT-PCRにより、作製した MCEI 遺伝子の cDNA には 1 ヶ所の変異が入っていたため、それを部位特異的変異により元に戻した。この pUC118 の EcoR I サイトにサブクローニングされている MCEI プラスミドを pMCEI-EcoR I と命名した。また、MCEI 遺伝子には、Asn 型糖鎖の認識部位 Asn-X-Ser/Thr 配列が 1 カ所あり、配列番号 7 のアミノ酸配列上の 50 番目の位置のアスパラギン残基に糖鎖が結合すると考えられた。RCEI の場合と同様に、アスパラギン結合型 (Asn 型) 糖鎖の過剰付加により、リヨセル毛羽除去活性が阻害されることが考えられたため、Asn 型糖鎖認識部位のアミノ酸を置換した変異型エンドグルカナーゼ MCEI 遺伝子を部位特異的変異により作出した。

部位特異的変異処理は、実施例 B 7 (1) の方法に従って行った。即ち、下記に示す 1 種の合成オリゴヌクレオチド pIMI-S52G を変異導入用プライマーとして作製し、5' 末端を予めリン酸化した。次に、プラスミド pMCEI-EcoR I で大腸菌 CJ236 株を形質転換し、ヘルパーファージを用いて ssDNA を得た。この ssDNA とプライマーを前述キットを用いてアニーリング、ポリメラーゼ反応により、二本鎖化し、大腸菌 JM109 株に導入することで変異 DNA を得た。この変異導入プラスミドを pMCEI-G とした。

PIMI-S52G : 5'-CTTGGTGCTGCCAGCGTTACCAG -3' (23mer) (配列番号 1 1 1)

(2) 変異型 MCEI 遺伝子の酵母における発現

変異型 MCEI 遺伝子の酵母における発現を実施例 B 7 (2) の方法にしたがって行った。即ち、実施例 E 3 (1) において得られたプラスミド pMCEI-G を EcoR I で

切断し、変異型MCEI遺伝子を回収した。これを、プラスミドベクターpY2831のEcoRIサイト、即ちグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（GAP）プロモーターの下流に作動可能に連結し、プラスミドpYMCEIを得た。このプラスミドにより、W097/00757号明細書に従って、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）MS-161株（MATa, trp1, ura3）を形質転換し、エンドグルカナーゼMCEIが発現し得る形質転換体を得た。

実施例 E 4：酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼMCEIの評価

（1）変異型MCEIが発現した酵母の培養

実施例 E 3 において得られたプラスミドpYMCEIによる酵母の形質転換体を、実施例 B 8（1）と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

（2）SDS-PAGEによる分子量の測定

実施例 E 4（1）において得られた粗酵素液をSDS-PAGEに供したところ、分子量が約45kDのスメアなバンドとして検出された。

（3）変異型MCEIが発現した酵母の評価（CMCアーゼ活性）

実施例 E 4（1）において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、変異型MCEI遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

	CMCアーゼ (U/ml)
変異型MCEI遺伝子組み換え株	0.337
コントロール	0.000

（4）酵母で発現した変異型MCEIの精製

実施例 E 4（1）において得られた粗酵素液500mlを最終濃度1.5M硫酸アンモニウムの溶液になるように調製した後、あらかじめ1.5Mの硫酸アンモニウム液で平衡化させたMacro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィー（ゲル体積25ml、バイオラッドラボラトリーズ社製）に流速3.0ml/minでアプライした。次に、脱イオン水中、硫酸アンモニウム濃度を1.5Mから0.3Mずつのステップワイズ分離法により流速5.0ml/minで溶出して、分画した。このうち、硫酸アンモニウム濃

度が 0.6M のときに得られた画分にリヨセルの毛羽除去活性が強く認められた。そこでこの画分 50ml を分取した。この Macro-Prep Methyl HIC Support 疎水クロマトグラフィーによる分画を 2 回繰り返すことにより、培養上清液 1000ml を処理し、活性画分 100ml を得た。

ここで得られた活性画分 100ml を最終濃度 1.5M 硫酸アンモニウムの溶液になるように調製し、あらかじめ 1.5M の硫酸アンモニウム液で平衡化させた Econo-Pac Methyl HIC Cartridge 疎水クロマトグラフィー（ゲル体積 5ml、バイオラッドラボラトリーズ社製）にアプライした。次に、1.5M 硫酸アンモニウム溶液を流した。次に脱イオン水を流し、溶出した画分を 1ml ずつ分画し、リヨセルの毛羽除去活性が強く認められた画分をプールした。この画分は SDS-PAGE においてほぼ単一の単一のバンドを示し、その分子量（MW）は約 45kD であった。SDS-PAGE は、NPU-12.5L 型パジェル（アトー株式会社製）を使用し、泳動および染色はゲルに添付の製品取扱説明書の方法に従った。分子量スタンダードは、SDS-PAGE 分子量スタンダード Lowレンジ（バイオラッドラボラトリーズ社製）を使用した。

（5）精製された変異型 MCEI のリヨセル毛羽除去の評価（リヨセル毛羽除去比活性）

実施例 E 4（4）において得られた変異型 MCEI 精製酵素液を用いて、実施例 A 4 の方法と同じように下記の条件でリヨセルの毛羽除去活性を評価した。すなわち、実施例 A 4 の方法で毛羽立たせたりヨセルニットの生地（豊島株式会社製 9cm×10cm、重量約 2g）を下記の条件でリヨセルの毛羽除去処理を行なうことにより、形成された毛羽が完全に除去されるのに要する変異型 MCEI のタンパク濃度を算出した。

変異型 MCEI のタンパク濃度は、TSKgel TMS-250 カラム（4.6mm I.D. X 7.5cm）（東ソー社製）を用いた HPLC 分析により、0.05% TFA（トリフルオロ酢酸）中、アセトニトリル濃度を 0% から 80% までのリニアグラジエントにより流速 1.0ml/min で溶出した各種エンドグルカナーゼの UV280nm でのピーク面積から算出した。スタンダードとしては、プロテインアッセイキット（バイオラッドラボラトリー社製）によりあらかじめタンパク濃度を測定しておいた精製 NCE 4 を同じく HPLC 分析したものを用いた。プロテインアッセイキットにおけるタンパク濃度測定のスタンダ

ードはAlbumin Standard (Bovine serum albumin, fraction V, PIERCE社製)を用いた。

試験機械：ラウンダーメーター (Launder Meter) L-12 (株式会社大栄科学精器製作所製)

温度：50℃

時間：60分

反応液量：40 ml

反応pH：pH5 (10mM酢酸緩衝液)

pH6 (10mM酢酸緩衝液)

処理液には、エンドグルカナーゼ溶液とともに約16gのゴムボールを4個加えた。

その結果は、下記の第6表に示されるとおりであった。実施例A2に示した方法により精製したエンドグルカナーゼMCEIと、酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼMCEIとでは酵素濃度あたりのリヨセル毛羽除去活性がほぼ同等であった。

第 6 表

酵素	pH 5	pH 6
変異型MCEI	0.5 mg / l	0.5 mg / l

(6) 酵母で発現させた変異型MCEIの各pHにおけるリヨセルの毛羽除去の評価 (MCEIのリヨセル毛羽除去活性におけるpHプロファイル)

実施例E4(1)において得られたMCEI粗酵素液を用いて、実施例A5の方法に従って50℃の条件で、pH4~10におけるリヨセルの毛羽除去活性を評価した。

その結果は、図2に示されるとおりであった。図から明らかなように、変異型MCEIの至適pHは5~6であり、pH5~8の範囲で至適pHにおける活性の60%以上の活性を有していた。実施例A2においてムコール・サーシネロイデスより精製したMCEIと同様に、酵母で発現させた変異型MCEIが精製NCE4に比べてアルカリ条件下において優位に高活性であることがこの結果より明らかである。

実施例F1：ファイコマイセス・ニテンスにおけるRCEI遺伝子の相同体遺伝子

の検索

ファイコマイセス・ニテンスのゲノムDNA中のエンドグルカナーゼRCE I 遺伝子の相同体遺伝子を検索するために、サザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。

まず、実施例B 2に従って得られたファイコマイセス・ニテンスのゲノムDNA約10 μ g を複数の制限酵素 (EcoR I, BamH I, Hind III, Sac I, Xba I, Sal I 等) で各々切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。これを実施例B 5 (3)に従って、メンブランにうつしとり、前述実施例と同一の条件にてRCEI遺伝子とコドン最適化RCE I遺伝子の2種をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。その結果、ファイコマイセス・ニテンスのゲノムDNA上には、コドン最適化RCE I 遺伝子と相同な遺伝子が少なくとも1種類存在することが明らかになった。

この遺伝子は、特にゲノムDNAをBam HIで切断した場合のハイブリダイゼーションにおいて、一本のバンドとして検出された。そのため、このおおよそ15~19kbpのバンドとして検出される遺伝子をPCEIとして、以降のクローニングを行った。

実施例F 2：エンドグルカナーゼPCEI遺伝子のクローニング

(1) ゲノムDNAライブラリー (PCEI遺伝子クローニング用) の作製

ファイコマイセス・ニテンスのゲノムDNAをBam HIにより消化し、Seakem LE アガロースを用いた0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、9~23 kbpの大きさのDNA断片を定法に従い、抽出、精製した。このDNA断片をファージベクター、Lambda DASH IIベクター (ストラタジーン社製) に連結し、実施例B 4と同様にパッケージングを行った。得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRA 株に感染させた。この方法により得られた 1.6×10^4 個のファージライブラリーを用いてPCEI遺伝子のクローニングを行った。

(2) ゲノムDNAからのPCEI遺伝子のクローニング

実施例F 2 (1) で得られたライブラリーと、コドン最適化RCEI遺伝子プローブを用いて、プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、実施例B 5と同様の条件にて行い、6個のファージクローンを得た。得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRA 株に感染させ、実施例B 5 (2) の方法に従って DNA を調製し、Xba Iで切断し、0.8%アガロースゲル電

気泳動に供した。これを実施例B 5 (3)の方法に従って、ナイロンメンブランにうつしとり、ハイブリダイゼーションした。その結果、6種のファージDNAにおいて、共通の約2.3kbpのバンドが検出された。このバンドを回収し、プラスミドpUC119のXba Iサイトにサブクローニングを行い、得られたプラスミドをpPCEI-Xbaとした。この約2.3kbpの塩基配列の決定は、実施例B 3 (3)と同様に行い、解読された塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、一つの読み枠が、実施例B 1において示されたエンドグルカナーゼ PCEIのN末端アミノ酸配列と一致した。しかしながら、この配列にはイントロンが含まれていることが推察されたため、RT-PCRによりPCEI遺伝子のcDNAの単離を行なった。

(3) RT-PCRによるPCEI遺伝子のcDNAの単離と塩基配列決定

ファイコマイセス・ニテンスを30mlの液体培地(3.0% コーンステープリカー、0.5% 酵母エキス(Difco社製)、2.4% ポテトデキストロースブロス(Difco社製)、2% スクロース)で30℃、48時間培養し、ガラスフィルターによって菌体を集菌した。得られた各菌体を凍結乾燥し、スパーテルにて細かく破碎した。全RNAはIsogen(和光純薬工業社製)を用いて単離した。まず、菌体粉末にIsogen 5mlを入れ、30秒間Vortexし、50℃、で10分間保温した。その後、室温で5分間放置した。次に、0.8mlのクロロホルムを加えて、激しく振とうした。遠心後、水層を別の容器に移し、これに2mlの4 M LiCl加えて混合し、-70℃で15分放置した。その後、遠心し、上清液を除いた後、沈殿を1.6mlの水で溶解し、次に1.6mlのイソプロパノールを加えて混合し、4℃、30分放置する。遠心後、上清液を除き、沈殿を75%エタノールで洗浄後、沈殿を1.6mlの水で溶解した。この液をエタノール沈殿し、沈殿を75%エタノールで洗浄後、乾燥し、0.4mlの水に溶解し、これを全RNAとした。

次に、mRNAの調製は、mRNA アイソレーションキット(Stratagene社製)を用いて行った。まず前記で調製した0.2mlの全RNAに10mlのエリ्यूションバッファーを加え、さらに5mlのオリゴdT溶液を加えた。上清液を除いた後、このオリゴdTをハイソルトバッファーで3回、ロウソルトバッファーで2回で洗浄の後、68℃に加温したエリ्यूションバッファーで溶出した。この溶液をエタノール沈殿し、沈殿を75%エタノールで洗浄後、乾燥し、15 μ lの水に溶解し、これをmRNA画分とした。

次に、RT-PCRによるmRNAからのPCEI遺伝子のcDNAの調整は、Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1を用いた。すなわち、前記において決定したゲノム由来のPCEI遺伝子配列から推定されるN末端およびC末端のプライマーとして以下の様な配列のオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、前に調整したmRNAのうち1 μ lを鋳型とし、PCEI遺伝子のcDNAのみをPCR法により増幅した。

PCEI-CN: 5'-GCGGATCCATGAAGTTCTCCATCATCG-3' (27mer) (配列番号112)

PCEI-CC: 5'-GCGGATCCTTACTTGCGCTCGCAACCA-3' (27mer) (配列番号113)

RT-PCR反応は、以下の条件で行った。まず、C末端のプライマーを加えて、逆転写酵素によって、反応させた後、Taq ポリメラーゼ (リコンビナントTaq、宝酒造社製)、N末端のプライマーを加え、94℃1分間、50℃2分間、72℃2分間の反応条件を30回繰り返すことにより増幅した。増幅された断片は、アガロースゲル電気泳動の結果、約1.0kbpの1断片であった。これをpUC118のBamHIサイトにサブクローニングし、この断片の塩基配列を実施例B3(3)の方法に従い、決定した。この塩基配列とゲノムの塩基配列を比較し、イントロンを決定した。この解析の結果、ファイコマイセス・ニテンスPCEI遺伝子のcDNA全塩基配列を決定した。

実施例 G 1 : 洗剤として配合した場合のフミコーラ・インソレンスによって発現されたエンドグルカナーゼ RCE Iの毛羽除去作用の評価

実施例D4で得られたフミコーラ・インソレンスによって発現されたエンドグルカナーゼ RCE Iの、セルロース含有繊維の毛羽除去活性を以下のように評価した。すなわち、実施例 D 4で調製したフミコーラ・インソレンスによって発現させたコドン最適化エンドグルカナーゼ RCE Iの培養上清液を用いて、界面活性剤およびゴムボールとともに大型ワッシャー中で毛羽立たせた綿ニット生地(6cm×8cm)の毛羽除去処理を下記の条件にて行なった。形成された毛羽が完全に除去されるのに要する培養上清液量を求めた。コントロールとしては非形質転換体である親株由来の培養上清液を用いた。

試験機械 : ラウンダーメーター (Launder Meter) L-12 (株式会社大栄科学精器製作所製)

温度 : 40℃

時間：60分

反応液量：40 ml

反応pH：pH8.5 (10mMトリス緩衝液)

(ノニオン性界面活性剤)

ノニポール100 (三洋化成工業社製) 0.15g/l

(アニオン性界面活性剤)

シャボン玉ベビー粉石鹼 (シャボン玉石鹼社製) 0.55g/l

処理液には、エンドグルカナーゼ溶液とともにゴムボールを適当量加えた。
その結果は、下記の第7表に示されるとおりであった。

第 7 表

		綿生地 of 毛羽除去に必要な 培養液上清液量 (ml)
フミコーラ・インソレンス MN200-1 (親株)	2 ml 添加しても約 60 % しか毛羽除去されなかった。	
フミコーラ・インソレンス pJI4D01 (2-15株)	0.1	

実施例 G2：フミコーラ・インソレンスによって発現されたエンドグルカナーゼ RCE I の古紙脱インキの評価

実施例 D4 で調製したフミコーラ・インソレンスによって発現されたコドン最適化エンドグルカナーゼ RCE I の培養液の遠心分離上清をさらに 0.45 ミクロンの精密濾過をおこなった後、全量を凍結乾燥し粗酵素粉末を得た。本粗酵素粉末は 1920 単位/g の HEC 活性を有していた。本粗酵素の酵素脱インキ能力を評価するために下記の酵素脱インキ試験を実施した。新聞紙をシュレッダーにより裁断した後、5 重量% の濃度となるよう 50℃ 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を添加し、10 分浸漬し新聞紙を膨潤させた。この後、50℃ に保温した JIS 標準離解機を用い 3 万回の攪拌を行い新聞紙の離解を行った。本離解物に粗酵素粉末 3mg/離解物 g (100 nkat/g 離解物) 及び 9mg/離解物 g (300 nkat/g 離解物) 相当の酵素溶液を投入し十分に攪拌し 120 分間 60℃ で保温した。

この後、酵素反応した離解物を標準離解機により1000回転攪拌し均一な離解物を得た。得られた離解物を1容量を、4容量の水道水で希釈後、脱インキ剤(Raisapon 104.1 g/L)、塩化カルシウム(200 mg/L)を添加しvoith flotation cellに供し50度で5分間フローテーションを行い浮上するインキを除去した。この後、手すきシートを調製、乾燥させ得られた古紙のISO白色度を白色度計により及び残存インキ面積をMinolta社製Quick Scan 35の測定を実施した。以上の手順により、酵素処理をしないもの、酵素処理したサンプル2実験区(100 nka/g、300 nkat/g)より得た3サンプルの分析結果を 第8表に示した。この結果より、酵素実験区より得た古紙の白色度が無処理の古紙の白色度に比較しいずれもまさることから、RCEIの古紙脱インキへの有効性が確認された。

第 8 表

添加酵素濃度	白色度	残インク面積%
無添加	46.9	1.19
100 nkat/g	47.6	
300 nkat/g	48.5	1.06

請求の範囲

1. 下記特性を有する酵素。
 - a) エンドグルカナーゼ活性を示す。
 - b) 1 mg タンパク質量 / 1 以下の濃度で精製セルロース繊維の毛羽を完全に除去できる。
2. pH 8.5 における精製セルロース繊維の毛羽除去活性が至適 pH における毛羽除去活性の 50% 以上を有する、請求項 1 に記載の酵素。
3. 接合菌類由来である、請求項 1 に記載の酵素。
4. リゾプス属由来であり、かつ SDS-PAGE により測定した平均分子量が約 40 kD である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の酵素。
5. 下記特性を有する請求項 4 に記載の酵素。
 - ・精製セルロース繊維毛羽除去活性に関する至適 pH : pH 約 5
 - ・精製セルロース繊維毛羽除去活性に関する至適温度 : 約 55℃
6. ムコール属由来であり、かつ SDS-PAGE により測定した平均分子量が約 41 kD である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の酵素。
7. 下記特性を有する請求項 6 に記載の酵素。
 - ・精製セルロース繊維毛羽除去活性に関する至適 pH : pH 約 5 ~ 約 6
 - ・精製セルロース繊維毛羽除去活性に関する至適温度 : 約 50℃
8. ファイコマイセス属由来であり、かつ SDS-PAGE により測定した平均分子量が約 45 kD である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の酵素。

9. 下記特性を有する請求項 8 に記載の酵素。

- ・精製セルロース繊維毛羽除去活性に関する至適 pH : pH 約 6
- ・精製セルロース繊維毛羽除去活性に関する至適温度 : 約 50℃

10. アミノ酸配列 (I) からなるセルロースバインディングドメインを含んでなり、かつエンドグルカナーゼ活性を示す酵素。

Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gln-Cys-Gly-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Asn-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln-Cys-Xaa (I) (配列番号 18)

(上記配列中、Xaaはそれぞれ任意のアミノ酸残基を示すが、20、21、22、23、24、30、および31位のXaaはそれぞれ存在しなくてもよい。11位および33位のXaaのいずれか一方はLysを表し、他方はLys以外のアミノ酸残基を表す。)

11. アミノ酸配列 (II) からなるセルロースバインディングドメインを含んでなり、かつエンドグルカナーゼ活性を示す酵素。

Cys-Ser-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln-Cys-Gly-Gly-Xaa-Xaa-Trp-Xaa-Gly-Pro-Thr-Cys-Cys-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Thr-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Asn-Xaa-Xaa-Tyr-Ser-Gln-Cys-Xaa (II) (配列番号 19)

(上記配列中、Xaaはそれぞれ任意のアミノ酸残基を示すが、20、21、23、29、および30位のXaaはそれぞれ存在しなくてもよい。)

12. 11位および32位のXaaのいずれか一方がLysを表し、他方がLys以外のアミノ酸残基を表す、請求項 11 に記載の酵素。

13. セルロースバインディングドメインがアミノ酸配列 (III) からなる、請求項 10 または 11 に記載の酵素。

Cys-Ser-X1-X2-Tyr-X3-Gln-Cys-Gly-Gly-X4-X5-Trp-X6-Gly-Pro-Thr-Cys-Cys-X7-X8-Gly-X9-Thr-Cys-X10-X11-X12-X13-X14-Asn-X15-X16-Tyr-Ser-Gln-Cys-X17 (III)

(配列番号 20)

(上記配列中、

X1は、Lys、Ser、またはGlnを表し、

X2は、Leu、Ala、Val、またはGlyを表し、

X3は、Gly、Tyr、またはSerを表し、

X4は、LysまたはIleを表し、

X5は、Asn、Asp、Gly、またはMetを表し、

X6は、Asn、Asp、Ser、またはThrを表し、

X7は、Glu、Asp、またはThrを表し、

X8は、SerまたはAlaを表し、

X9は、SerまたはPheを表し、

X10は、LysまたはValを表し、

X11は、Val、Asp、Ala、またはGlyを表し、

X12は、Ser、Tyr、Gln、またはAlaを表し、

X13は、Pro、Glu、またはLysを表すか、あるいは存在せず、

X14は、Asp、Gly、またはAsnを表すか、あるいは存在せず、

X15は、Asp、Pro、Lys、またはGluを表し、

X16は、Tyr、Phe、またはTrpを表し、

X17は、Leu、Val、またはIleを表し、

X4およびX15のいずれか一方がLysを表し、他方はLys以外のアミノ酸残基を表す。)

14. アミノ酸配列(IV)からなるセルロースバインディングドメインを有する請求項10または11に記載の酵素。

Cys-Ser-Lys-X21-Tyr-X22-Gln-Cys-Gly-Gly-Lys-X23-Trp-X24-Gly-Pro-Thr-Cys-Cys-Glu-Ser-Gly-Ser-Thr-Cys-X25-X26-X27-X28-X29-Asn-X30-X31-Tyr-Ser-Gln-Cys-X32

(IV) (配列番号 21)

(上記配列中、

X21は、LeuまたはAlaを表し、

X22は、GlyまたはTyrを表し、
X23は、AsnまたはAspを表し、
X24は、AsnまたはAspを表し、
X25は、LysまたはValを表し、
X26は、ValまたはAspを表し、
X27は、SerまたはTyrを表し、
X28は、Proを表すか、あるいは存在せず、
X29は、Aspを表すか、あるいは存在せず、
X30は、AspまたはProを表し、
X31は、TyrまたはPheを表し、
X32は、LeuまたはValを表す)

15. セルロースバインディングドメインが配列番号22、23、および24のいずれかのアミノ酸配列からなる、請求項14に記載の酵素。

16. 下記のアミノ酸配列からなるセルロースバインディングドメインを有する請求項10または11に記載の酵素。

Cys-Ser-Ser-Val-Tyr-X41-Gln-Cys-Gly-Gly-Ile-Gly-Trp-X42-Gly-Pro-Thr-Cys-Cys-X43-X44-Gly-Ser-Thr-Cys-X45-Ala-Gln-X46-X47-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Cys-X48

(V) (配列番号25)

(上記配列中、

X41は、GlyまたはSerを表し、
X42は、SerまたはThrを表し、
X43は、GluまたはAspを表し、
X44は、SerまたはAlaを表し、
X45は、ValまたはLysを表し、
X46は、GluまたはLysを表し、
X47は、GlyまたはAspを表し、
X48は、LeuまたはIleを表す。)

17. セルロースバインディングドメインが配列番号26または27のアミノ酸配列からなる、請求項16に記載の酵素。
18. セルロースバインディングドメインが配列番号28のアミノ酸配列からなる、請求項10または11に記載の酵素。
19. セルロースバインディングドメインがN末端側に存在する、請求項10または11に記載の酵素。
20. 1mgタンパク質量/1以下の濃度で精製セルロース繊維の毛羽を完全に除去できる、請求項10～19のいずれか一項に記載の酵素。
21. pH8.5における精製セルロース繊維の毛羽除去活性が至適pHにおける毛羽除去活性の50%以上を有する、請求項10～20のいずれか一項に記載の酵素。
22. 接合菌類由来である、請求項10～21のいずれか一項に記載の酵素。
23. アミノ酸配列(VI)からなるリンカー領域の一部分を更に含んでなる、請求項10～22のいずれか一項に記載の酵素
Tyr-Xaa-Xaa-Xaa-X51-Gly-Gly-Xaa-X52-Gly (VI) (配列番号31)
(上記配列中、Xaaはそれぞれ任意のアミノ酸残基を示し、X51およびX52はそれぞれSerまたはThrを表す。)
24. リンカー領域の一部分がアミノ酸配列(VII)からなる、請求項23に記載の酵素。
Tyr-X61-Xaa-X62-X51-Gly-Gly-Xaa-X52-Gly (VII) (配列番号32)
(上記配列中、

Xaaは任意のアミノ酸残基を表し、
X51およびX52はそれぞれSerまたはThrを表し、
X61はLysまたはSerを表し、
X62はIleまたはValを表す。)

25. 3位のXaaがAla、Ile、Pro、またはValであり、8位のXaaがAla、Phe、またはLysである、請求項24記載の酵素。

26. X51およびX52がSerである、請求項23～25のいずれか一項に記載の酵素。

27. リンカー領域の一部分が配列番号33、34、35、36、および37のいずれかに記載の配列からなる、請求項23に記載の酵素。

28. リンカー領域の一部分がカタライティックドメインのN末端側に存在する、請求項23～27のいずれか一項に記載の酵素。

29. アミノ酸配列(VI)からなるリンカー領域の一部分を含んでなり、かつエンドグルカナーゼ活性を示す酵素。

Tyr-Xaa-Xaa-Xaa-X51-Gly-Gly-Xaa-X52-Gly (VI) (配列番号31)
(上記配列中、Xaaはそれぞれ任意のアミノ酸残基を示し、X51およびX52はそれぞれSerまたはThrを表す。)

30. リンカー領域の一部分がアミノ酸配列(VII)からなる、請求項29に記載の酵素。

Tyr-X61-Xaa-X62-X51-Gly-Gly-Xaa-X52-Gly (VII) (配列番号32)
(上記配列中、

Xaaは任意のアミノ酸残基を表し、
X51およびX52はそれぞれSerまたはThrを表し、

X61はLysまたはSerを表し、
X62はIleまたはValを表す。)

31. 3位のXaaがAla、Ile、Pro、またはValであり、8位のXaaがAla、Phe、またはLysである、請求項30記載の酵素。

32. X51およびX52がSerである、請求項29～31のいずれか一項に記載の酵素。

33. リンカー領域の一部分が配列番号33、34、35、36、および37のいずれかに記載の配列からなる、請求項29に記載の酵素。

34. 1mgタンパク質量／1以下の濃度で精製セルロース繊維の毛羽を完全に除去できる、請求項29～33のいずれか一項に記載の酵素。

35. pH8.5における精製セルロース繊維の毛羽除去活性が至適pHにおける毛羽除去活性の50%以上を有する、請求項29～34のいずれか一項に記載の酵素。

36. 接合菌類由来である、請求項29～35のいずれか一項に記載の酵素。

37. 下記の特性を有するエンドグルカナーゼ：

- i) ファミリー45に属する。
- ii) 糸状菌由来である。
- iii) セルロースバインディングドメインがN末端側に存在する。

38. セルロースバインディングドメインが請求項10～18のいずれか一項に記載のアミノ酸配列から選択される、請求項37に記載の酵素。

39. 糸状菌がリゾプス属、ムコール属、またはファイコマイセス属に属する菌である、請求項37に記載の酵素。

40. 配列番号1、3、5、7、9、または11に記載されるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、またはそれらの相同体。

41. アスパラギン結合型(Asn型)糖鎖が付加しないように改変された、請求項1～39のいずれか一項に記載の酵素および請求項40に記載の改変タンパク質。

42. 改変が、Asn型糖鎖認識部位Asn-Xaa-Ser/Thr(Xaaは任意のアミノ酸残基を表す)におけるAsn、Ser、および/またはThrの他のアミノ酸への置換、および/またはXaaのProへの置換である、請求項41に記載の改変タンパク質。

43. 改変が、Asn型糖鎖認識部位Asn-Xaa-Ser/Thr(Xaaは任意のアミノ酸残基を表す)におけるAsnのAspまたはGlnへの置換、および/またはSerまたはThrのAla、Gly、またはLeuへの置換、および/またはXaaのProへの置換である、請求項41に記載の改変タンパク質。

44. 配列番号1の45番または47番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号1の改変アミノ酸配列からなる、請求項41に記載の改変タンパク質。

45. 配列番号1の45番または47番のアミノ酸残基、および90番または92番のアミノ酸残基および/または130番または132番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号1の改変アミノ酸配列からなる、請求項41に記載の改変タンパク質。

46. 配列番号3の45番または47番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号3の改変アミノ酸配列からなる、請求項41に記載の改変タンパク質。

47. 配列番号3の45番または47番のアミノ酸残基、および92番または94番のアミノ酸残基、119番または121番、122番または124番、および/または158番または160番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号3の改変アミノ酸配列からなる、請求項41に記載の改変タンパク質。

48. 配列番号5の44番または46番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号5の改変アミノ酸配列からなる、請求項41に記載の改変タンパク質。

49. 配列番号5の44番または46番のアミノ酸残基、および49番または51番のアミノ酸残基、121番または123番、および/または171番または173番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号5の改変アミノ酸配列からなる、請求項41に記載の改変タンパク質。

50. 配列番号7の50番または52番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号7の改変アミノ酸配列からなる、請求項41に記載の改変タンパク質。

51. 配列番号9の99番または101番のアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換された配列番号9の改変アミノ酸配列からなる、請求項41に記載の改変タンパク質。

52. セルロースバインディングドメインが改変された配列番号1、3、5、7、9、または11に記載の改変アミノ酸配列からなる、請求項40に記載の改

変タンパク質。

53. リンカー領域の一部分が改変された配列番号1、3、5、7、9、または11に記載の改変アミノ酸配列からなる、請求項40に記載の改変タンパク質。

54. セルロースバインディングドメインおよびリンカー領域の一部分が改変された配列番号1、3、5、7、9、または11に記載の改変アミノ酸配列からなる、請求項40に記載の改変タンパク質。

55. セルロースバインディングドメインが請求項10、11、13、14、または16に記載のアミノ酸配列(I)～(V)を表すように改変された配列番号1、3、5、7、9、または11に記載の改変アミノ酸配列(セルロースバインディングドメイン以外の領域が改変されていてもよい)からなる、請求項40に記載の改変タンパク質。

56. リンカー領域の一部分が請求項23または24に記載のアミノ酸配列(VI)または(VII)を表すように改変された配列番号1、3、5、7、9、または11に記載の改変アミノ酸配列(リンカー領域の一部分以外の領域が改変されていてもよい)からなる、請求項40に記載の改変タンパク質。

57. セルロースバインディングドメインが請求項10、11、13、14、または16に記載のアミノ酸配列(I)～(V)を表すように改変され、かつリンカー領域の一部分が請求項23または24に記載のアミノ酸配列(VI)または(VII)を表すように改変された配列番号1、3、5、7、9、または11に記載の改変アミノ酸配列(セルロースバインディングドメインおよびリンカー領域の一部分以外の領域が改変されていてもよい)からなる、請求項40に記載の改変タンパク質。

58. セルロースバインディングドメインおよびリンカー領域の一部分以外の領域が改変された配列番号1、3、5、7、9、または11に記載の改変アミノ酸配列からなる、請求項40に記載の改変タンパク質。

59. セルロースバインディングドメイン、リンカー領域の一部分、およびカタライティックドメイン以外の領域が改変された配列番号1、3、5、7、9、または11に記載の改変アミノ酸配列からなる、請求項40に記載の改変タンパク質。

60. 請求項1～59のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、またはそれらの相同体をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、ポリヌクレオチド。

61. 配列番号2、4、6、8、10、または12に記載のDNA配列、またはその改変配列を含んでなる、請求項60に記載のポリヌクレオチド。

62. 宿主において高頻度に使用されるコドンを選択することにより、宿主に対してコドンが最適化されたヌクレオチド配列を含んでなる、請求項60または61に記載のポリヌクレオチド。

63. コドンが最適化されたヌクレオチド配列が、配列番号13に記載のDNA配列である、請求項62に記載のポリヌクレオチド。

64. 請求項60～63のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含んでなる、発現ベクター。

65. 請求項60～63のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項64に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

66. 宿主細胞が、酵母または糸状菌である、請求項65に記載の宿主細胞。
67. 酵母が、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、ハンゼヌラ (Hansenula) 属またはピキア (Pichia) 属に属するものである、請求項66に記載の宿主細胞。
68. 酵母が、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) である、請求項66に記載の細胞。
69. 糸状菌が、フミコーラ (Humicola) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属またはフザリウム (Fusarium) 属に属するものである、請求項66に記載の宿主細胞。
70. 糸状菌が、フミコーラ・インソレンス (Humicola insolens)、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)、またはトリコデルマ・ビリデ (Trichoderma viride) である、請求項66に記載の宿主細胞。
71. 請求項65～70のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養し、その宿主細胞および／またはその培養物から請求項1～59のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、またはその相同体を採取する工程を含んでなる、請求項1～59のいずれか一項に記載の酵素、その改変タンパク質、またはその相同体の製造法。
72. 請求項71に記載の方法で生産された、エンドグルカナーゼ酵素。
73. 請求項1～59および72のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、またはその相同体を含んでなる、セルラーゼ調製物。
74. セルロース含有繊維の処理方法であって、セルロース含有繊維を、請

求項 1～59 および 72 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 73 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

75. セルロース含有繊維が毛羽立ち始める速度を低減するかまたはセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～59 および 72 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 73 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

76. セルロース含有繊維の肌触りおよび外観の改善を目的とした減量加工する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～59 および 72 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 73 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

77. 着色されたセルロース含有繊維の色の澄明化を行う方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1～59 および 72 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 73 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

78. 着色されたセルロース含有繊維の色の局所的な変化を提供する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1～59 および 72 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 73 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

79. セルロース含有繊維がごわ付き始める速度を低減するかまたはセルロース含有繊維がごわ付きを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～59 および 72 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タン

パク質、若しくはその相同体、または請求項 7 3 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

8 0. 繊維の処理がその繊維の浸漬、洗濯、またはすすぎを通じて行われる、請求項 7 4 ～ 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

8 1. 請求項 1 ～ 5 9 および 7 2 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 7 3 に記載のセルラーゼ調製物を、飛散性のない顆粒状、安定化された液体状で含んでなる、洗剤添加物。

8 2. 請求項 1 ～ 5 9 および 7 2 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 7 3 に記載のセルラーゼ調製物を含んでなる、洗剤組成物。

8 3. 紙パルプのろ水性の改善方法であって、紙パルプを、請求項 1 ～ 5 9 および 7 2 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 7 3 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

8 4. 古紙の脱インキ方法であって、古紙を、脱インキ薬品の存在下、請求項 1 ～ 5 9 または 7 2 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 7 3 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

8 5. 動物飼料の消化能を改善する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1 ～ 5 9 および 7 2 のいずれか一項に記載の酵素、タンパク質、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 7 3 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/3

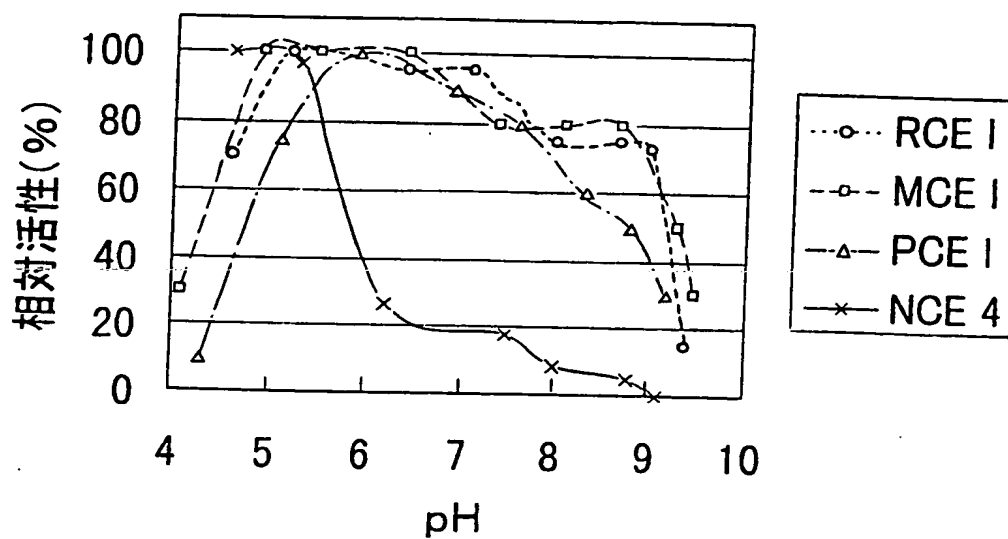


FIG. 1

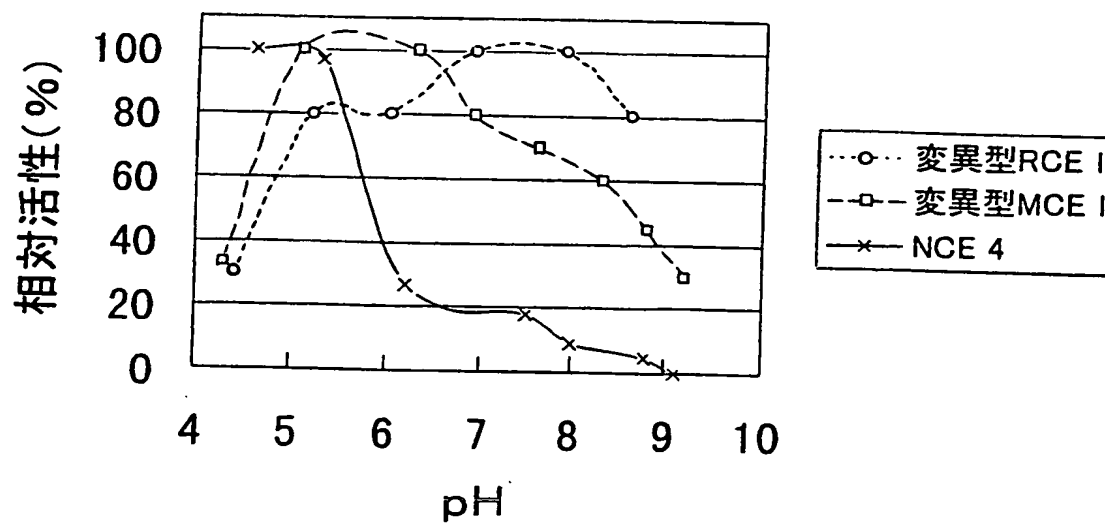


FIG. 2

2/3

Codon	Count	Codon	Count	Codon	Count	Codon	Count
TTT-Phe	2	TCT-Ser	24	TAT-Tyr	4	TGT-Cys	20
TTC-Phe	6	TCC-Ser	9	TAC-Tyr	8	TGC-Cys	6
TTA-Leu	0	TCA-Ser	2	TAA-***	1	TGA-***	0
TTG-Leu	3	TCG-Ser	1	TAG-***	0	TGG-Trp	10
CTT-Leu	8	CCT-Pro	7	CAT-His	1	CGT-Arg	1
CTC-Leu	3	CCC-Pro	5	CAC-His	1	CGC-Arg	1
CTA-Leu	0	CCA-Pro	1	CAA-Gln	9	CGA-Arg	0
CTG-Leu	1	CCG-Pro	0	CAG-Gln	1	CGG-Arg	0
ATT-Ile	6	ACT-Thr	19	AAT-Asn	10	AGT-Ser	6
ATC-Ile	3	ACC-Thr	7	AAC-Asn	16	AGC-Ser	11
ATA-Ile	0	ACA-Thr	2	AAA-Lys	10	AGA-Arg	3
ATG-Met	6	ACG-Thr	1	AAG-Lys	17	AGG-Arg	0
GTT-Val	4	GCT-Ala	17	GAT-Asp	7	GGT-Gly	34
GTC-Val	7	GCC-Ala	12	GAC-Asp	7	GGC-Gly	8
GTA-Val	3	GCA-Ala	2	GAA-Glu	12	GGA-Gly	2
GTG-Val	0	GCG-Ala	0	GAG-Glu	0	GGG-Gly	0

FIG. 3

Codon	Count	Codon	Count	Codon	Count	Codon	Count
TTT-Phe	0	TCT-Ser	2	TAT-Tyr	4	TGT-Cys	0
TTC-Phe	19	TCC-Ser	9	TAC-Tyr	18	TGC-Cys	18
TTA-Leu	0	TCA-Ser	0	TAA-***	1	TGA-***	0
TTG-Leu	0	TCG-Ser	7	TAG-***	0	TGG-Trp	10
CTT-Leu	1	CCT-Pro	3	CAT-His	0	CGT-Arg	4
CTC-Leu	13	CCC-Pro	13	CAC-His	7	CGC-Arg	13
CTA-Leu	0	CCA-Pro	0	CAA-Gln	1	CGA-Arg	0
CTG-Leu	8	CCG-Pro	8	CAG-Gln	17	CGG-Arg	0
ATT-Ile	3	ACT-Thr	0	AAT-Asn	1	AGT-Ser	0
ATC-Ile	13	ACC-Thr	25	AAC-Asn	33	AGC-Ser	12
ATA-Ile	0	ACA-Thr	0	AAA-Lys	0	AGA-Arg	0
ATG-Met	12	ACG-Thr	2	AAG-Lys	17	AGG-Arg	4
GTT-Val	3	GCT-Ala	10	GAT-Asp	8	GGT-Gly	12
GTC-Val	19	GCC-Ala	29	GAC-Asp	19	GGC-Gly	30
GTA-Val	0	GCA-Ala	0	GAA-Glu	0	GGA-Gly	0
GTG-Val	2	GCG-Ala	2	GAG-Glu	20	GGG-Gly	0

FIG. 4

3/3

Codon	Count	Codon	Count	Codon	Count	Codon	Count
TTT-Phe	2	TCT-Ser	3	TAT-Tyr	2	TGT-Cys	1
TTC-Phe	14	TCC-Ser	2	TAC-Tyr	18	TGC-Cys	10
TTA-Leu	1	TCA-Ser	0	TAA-***	0	TGA-***	1
TTG-Leu	3	TCG-Ser	14	TAG-***	0	TGG-Trp	12
CTT-Leu	4	CCT-Pro	6	CAT-His	0	CGT-Arg	1
CTC-Leu	16	CCC-Pro	15	CAC-His	7	CGC-Arg	16
CTA-Leu	0	CCA-Pro	0	CAA-Gln	2	CGA-Arg	0
CTG-Leu	3	CCG-Pro	11	CAG-Gln	19	CGG-Arg	2
ATT-Ile	5	ACT-Thr	7	AAT-Asn	4	AGT-Ser	0
ATC-Ile	16	ACC-Thr	30	AAC-Asn	25	AGC-Ser	11
ATA-Ile	0	ACA-Thr	0	AAA-Lys	0	AGA-Arg	0
ATG-Met	6	ACG-Thr	6	AAG-Lys	12	AGG-Arg	2
GTT-Val	4	GCT-Ala	13	GAT-Asp	2	GGT-Gly	12
GTC-Val	20	GCC-Ala	45	GAC-Asp	17	GGC-Gly	24
GTA-Val	0	GCA-Ala	0	GAA-Glu	1	GGA-Gly	1
GTG-Val	2	GCG-Ala	7	GAG-Glu	20	GGG-Gly	0

FIG. 5

Codon	Count	Codon	Count	Codon	Count	Codon	Count
TTT-Phe	1	TCT-Ser	2	TAT-Tyr	0	TGT-Cys	0
TTC-Phe	15	TCC-Ser	12	TAC-Tyr	6	TGC-Cys	20
TTA-Leu	0	TCA-Ser	0	TAA-***	0	TGA-***	0
TTG-Leu	1	TCG-Ser	4	TAG-***	1	TGG-Trp	9
CTT-Leu	2	CCT-Pro	7	CAT-His	1	CGT-Arg	3
CTC-Leu	7	CCC-Pro	9	CAC-His	1	CGC-Arg	7
CTA-Leu	0	CCA-Pro	2	CAA-Gln	1	CGA-Arg	0
CTG-Leu	3	CCG-Pro	6	CAG-Gln	12	CGG-Arg	1
ATT-Ile	2	ACT-Thr	5	AAT-Asn	3	AGT-Ser	1
ATC-Ile	4	ACC-Thr	17	AAC-Asn	11	AGC-Ser	13
ATA-Ile	0	ACA-Thr	1	AAA-Lys	0	AGA-Arg	0
ATG-Met	2	ACG-Thr	2	AAG-Lys	10	AGG-Arg	1
GTT-Val	2	GCT-Ala	9	GAT-Asp	4	GGT-Gly	5
GTC-Val	11	GCC-Ala	17	GAC-Asp	13	GGC-Gly	26
GTA-Val	0	GCA-Ala	0	GAA-Glu	0	GGA-Gly	2
GTG-Val	4	GCG-Ala	2	GAG-Glu	6	GGG-Gly	0

FIG. 6

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> Endoglucanase and cellulase composition containing the
same

<130> 121659PX

<140>

<141>

<150> JP302387/1998

<151> 1998-10-23

<160> 113

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 328

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-23)... (-1)

<221> mat_peptide

<222> (1)... (315)

<400> 1

Met Lys Phe Ile Thr Ile Ala Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
 -20 -15 -10
 Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln
 -5 1 5
 Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser
 10 15 20 25
 Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ser Gly
 30 35 40
 Ser Ser Gly Asn Lys Ser Ser Glu Ser Ala His Lys Lys Thr Thr Thr
 45 50 55
 Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr
 60 65 70
 Ala Pro Ala Lys Lys Thr Thr Thr Val Ala Lys Ala Ser Thr Pro Ser
 75 80 85
 Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly
 90 95 100 105
 Ala Ser Gly Asn Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala
 110 115 120
 Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser
 125 130 135
 Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Ala Gln Ser
 140 145 150
 Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp
 155 160 165
 Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser
 170 175 180 185
 Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe

	190		195		200
Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Val Thr Asn					
205		210		215	
Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln					
220		225		230	
Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln Trp					
235		240		245	
Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser					
250		255		260	265
Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys					
270		275		280	
Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr					
285		290		295	
Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser					
300		305		310	
Arg Lys					
315					

<210> 2

<211> 1017

<212> DNA

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)... (69)

<221> mat_peptide

<222> (70)... (1017)

<400> 2

atg aag ttt att act att gcc tct tcc gct ctc ttg gct ctc gcc ctc 48
 Met Lys Phe Ile Thr Ile Ala Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
 -20 -15 -10
 ggt act gaa atg gcc tct gct gct gaa tgt agc aaa ttg tat ggt caa 96
 Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln
 -5 1 5
 tgt ggt ggt aag aac tgg aat ggc cct act tgt tgt gaa tct gga tcc 144
 Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser
 10 15 20 25
 acc tgt aaa gaa agc aac gat tac tac tct caa tgt ctt ccc tct gga 192
 Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ser Gly
 30 35 40
 agc agt ggc aat aaa tct tct gaa agt gct cac aag aag act acc act 240
 Ser Ser Gly Asn Lys Ser Ser Glu Ser Ala His Lys Lys Thr Thr Thr
 45 50 55
 gct gct cac aag aag act act acc gct gct cat aaa aag act acc act 288
 Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr
 60 65 70
 gct cct gct aag aag act aca act gtt gcc aaa gct tcc acc cct tct 336
 Ala Pro Ala Lys Lys Thr Thr Thr Val Ala Lys Ala Ser Thr Pro Ser
 75 80 85
 aac tct agc tct agc tcc agc ggc aaa tat tcc gct gtc tct ggt ggt 384
 Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly
 90 95 100 105
 gcc tct ggt aac ggt gtc act act cgt tat tgg gat tgc tgt aag gcc 432
 Ala Ser Gly Asn Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala
 110 115 120
 tcc tgt agc tgg ccc ggt aag gcc aat gtc agt tct cct gtc aag tcc 480
 Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser

125	130	135	
tgt aac aaa gat ggt gtc act gcc ctt agt gac agc aat gcc caa agt			528
Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Ala Gln Ser			
140	145	150	
ggc tgt aac ggt ggt aac agt tac atg tgt aac gac aac caa cct tgg			576
Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp			
155	160	165	
gct gla aac gac aac ctt gcc tat ggt ttc gct gct gct gcc atc agt			624
Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser			
170	175	180	185
ggc ggt ggt gaa tct cgc tgg tgc tgt tct tgt ttc gaa ctt act ttc			672
Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe			
190	195	200	
act tct acc tct gtt gct ggt aag aag atg gtt gtc caa gtc act aac			720
Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Val Thr Asn			
205	210	215	
act ggt ggt gat ctt ggc tcc tct act ggt gct cac ttt gac ttg caa			768
Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln			
220	225	230	
atg ccc ggt ggt ggt gtt ggt att ttc aat ggt tgt tcc agc caa tgg			816
Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln Trp			
235	240	245	
ggc gct ccc aat gac ggt tgg ggc tca aga tac ggt ggt att tct tct			864
Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser			
250	255	260	265
gca tct gac tgc tct agt ctt cct tcc gca ctc caa gct ggt tgt aaa			912
Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys			
270	275	280	
tgg aga ttc aac tgg ttc aag aac gct gat aac cca agc atg act tac			960

Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr
 285 290 295
 aag gaa gtt acc tgt cct aag gaa atc acc gcc aag aca ggt tgt tca 1008
 Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser
 300 305 310
 aga aaa taa
 Arg Lys
 315

1017

<210> 3

<211> 366

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-23)... (-1)

<221> mat_peptide

<222> (1)... (343)

<400> 3

Met Lys Phe Ile Thr Ile Thr Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
 -20 -15 -10
 Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Lys Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln
 -5 1 5
 Cys Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser
 10 15 20 25
 Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu
 30 35 40

Ser Asn Gly Asn Lys Ser Ser Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys
45 50 55
Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr
60 65 70
Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu Ser
75 80 85
Asn Gly Asn Lys Thr Ser Glu Ser Ala His Lys Thr Thr Thr Thr Thr
90 95 100 105
Ala Pro Ala Lys Glu Ile Thr Thr Thr Ala Lys Ala Ser Asn Ser Ser
110 115 120
Asn Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ile Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn
125 130 135
Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp
140 145 150
Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp
155 160 165
Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Val Gln Ser Gly Cys Asn Gly
170 175 180 185
Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp
190 195 200
Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu
205 210 215
Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser
220 225 230
Val Ala Gly Lys Lys Met Val Ile Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp
235 240 245
Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly
250 255 260 265
Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Gly Ala Pro Asn

270 275 280
Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys
285 290 295
Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn
300 305 310
Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr
315 320 325
Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser Arg Lys
330 335 340

<210> 4

<211> 1101

<212> DNA

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)... (69)

<221> mat_peptide

<222> (70)... (1101)

<400> 4

atg aag ttt att act att acc tct tcc gct ctc ttg gct ctc gcc ctt 48
Met Lys Phe Ile Thr Ile Thr Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
-20 -15 -10
ggc act gaa atg gcc tct gct gct aaa tgt agc aag ctg tat ggt caa 96
Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Lys Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln
-5 1 5
tgt ggt ggt aag gac tgg aat ggc cct act tgt tgc gaa tct gga tcc 144
Cys Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser



10	15	20	25	
acc tgt aaa gta agc aac gat tac tac tct caa tgt ctt gcc cct gaa	192			
Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu				
30	35	40		
agc aac ggc aat aag tct tct gaa tgt agc aag ttg tat ggt caa tgt	240			
Ser Asn Gly Asn Lys Ser Ser Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys				
45	50	55		
ggt ggt aag gac tgg aat ggc cct act tgt tgc gaa tct gga tcc acc	288			
Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr				
60	65	70		
tgt aaa gta agc aac gat tac tac tct caa tgt ctt gcc cct gaa agc	336			
Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu Ser				
75	80	85		
aat ggc aat aaa act tct gaa agc gct cat aaa acg act act acc act	384			
Asn Gly Asn Lys Thr Ser Glu Ser Ala His Lys Thr Thr Thr Thr Thr				
90	95	100	105	
gct ccc gct aag gaa att aca act act gcc aaa gct tca aac tct tct	432			
Ala Pro Ala Lys Glu Ile Thr Thr Thr Ala Lys Ala Ser Asn Ser Ser				
110	115	120		
aac tct agc ggc aaa tac tcc att gtc tct ggt ggt gcc tct ggt aac	480			
Asn Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ile Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn				
125	130	135		
ggt gtc act act cgt tat tgg gat tgc tgt aag gcc tcc tgt agc tgg	528			
Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp				
140	145	150		
ccc ggt aag gcc aat gtc agt tct cct gtc aag tcc tgt aac aaa gat	576			
Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp				
155	160	165		
ggt gtc act gcc ctt agt gac agc aat gtc caa agt ggc tgt aac ggt	624			

Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Val Gln Ser Gly Cys Asn Gly
 170 175 180 185
 ggt aac agt tac atg tgt aac gac aac cag cct tgg gct gta aac gat 672
 Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp
 190 195 200
 aat ctt gcc tat ggt ttc gct gct gct gcc atc agt ggt ggt ggt gaa 720
 Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu
 205 210 215
 tct cgc tgg tgc tgt tct tgt ttc gaa ctt act ttc act tct acc tct 768
 Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser
 220 225 230
 gtt gct ggt aag aag atg gtt atc caa gtc act aac act ggt ggt gat 816
 Val Ala Gly Lys Lys Met Val Ile Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp
 235 240 245
 ctt ggc tcc tct act ggt gct cac ttt gac ttg caa atg ccc ggt ggt 864
 Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly
 250 255 260 265
 ggt gtt ggt att ttc aat ggt tgc tcc aag caa tgg ggt gct ccc aat 912
 Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Gly Ala Pro Asn
 270 275 280
 gac ggt tgg ggc tgc aga tac ggt ggt att tct tct gca tct gac tgc 960
 Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys
 285 290 295
 tct agt ctt cct tcc gca ctc caa gct ggt tgt aaa tgg aga ttc aac 1008
 Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn
 300 305 310
 tgg ttc aag aac gct gat aac cca agc atg act tac aag gaa gtt acc 1056
 Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr
 315 320 325



8

2

8

1

2

tgt ccc aag gaa atc acc gcc aag aca ggt tgt tca aga aaa taa 1101
Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser Arg Lys

330 335 340

<210> 5

<211> 360

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-23)... (-1)

<221> mat_peptide

<222> (1)... (337)

<400> 5

Met Lys Phe Leu Thr Ile Ala Ser Ser Ala Ile Leu Ala Leu Ala Val

-20

-15

-10

Gly Thr Glu Met Ala His Ala Ala Glu Cys Ser Lys Ala Tyr Tyr Gln

-5

1

5

Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asp Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser

10

15

20

25

Thr Cys Val Asp Tyr Pro Asp Asn Pro Phe Tyr Ser Gln Cys Val Pro

30

35

40

Asn Glu Asn Leu Thr Ser Thr Asn Lys Ser Ser His Lys Thr Thr Thr

45

50

55

Thr Glu Ser Ala Lys Lys Thr Thr Thr Thr Lys Gly Ser Lys Lys Thr

60

65

70

Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys Lys Thr Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys



5
1
1

11
1
1

75 80 85
Lys Thr Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys Lys Thr Thr Thr Thr Thr Lys
90 95 100 105
Lys Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Thr Asn
110 115 120
Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn Gly Glu Thr Thr Arg
125 130 135
Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asp
140 145 150
Val Thr Ser Pro Val Gly Ser Cys Asn Lys Asp Gly Lys Thr Leu Ala
155 160 165
Asp Asn Asn Thr Gln Asn Gly Cys Val Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Cys
170 175 180 185
Asn Asp Asn Gln Pro Trp Val Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Phe
190 195 200
Ala Ala Ala Ser Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala Thr Trp Cys Cys Ala
205 210 215
Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ala Val Lys Gly Lys Lys Met
220 225 230
Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Ser Asp Leu Gly Ser Asn Thr Gly
235 240 245
Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Tyr Asn
250 255 260 265
Gly Cys Ala Thr Gln Trp Gly Ala Pro Thr Asp Gly Trp Gly Ala Arg
270 275 280
Tyr Gly Gly Val Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Asn Leu Pro Ser Ala
285 290 295
Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn Ala Asp
300 305 310



11

12

Asn Pro Thr Met Thr Tyr Lys Gln Val Thr Cys Pro Lys Ala Ile Thr

315

320

325

Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg Lys

330

335

<210> 6

<211> 1083

<212> DNA

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)... (69)

<221> mat_peptide

<222> (70)... (1083)

<400> 6

atg aag ttc ctt acc att gcc tcc tcc gct atc ttg gca ctt gcc gtc 48

Met Lys Phe Leu Thr Ile Ala Ser Ser Ala Ile Leu Ala Leu Ala Val

-20

-15

-10

ggt act gaa atg gcc cat gct gct gaa tgt agc aag gct tac tac caa 96

Gly Thr Glu Met Ala His Ala Ala Glu Cys Ser Lys Ala Tyr Tyr Gln

-5

1

5

tgt ggt ggt aag aac tgg gat gga cct acc tgc tgt gaa tct ggc tct 144

Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asp Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser

10

15

20

25

act tgc gtt gat tat cct gac aat cct ttc tac tcc caa tgt gtt ccc 192

Thr Cys Val Asp Tyr Pro Asp Asn Pro Phe Tyr Ser Gln Cys Val Pro

30

35

40

aat gaa aac ctc acc tcc act aac aaa tct tct cac aaa acc acc act 240



Asn Glu Asn Leu Thr Ser Thr Asn Lys Ser Ser His Lys Thr Thr Thr	
45 50 55	
act gag agt gcc aag aag act acc act act aaa ggt tcc aag aag acc	288
Thr Glu Ser Ala Lys Lys Thr Thr Thr Thr Lys Gly Ser Lys Lys Thr	
60 65 70	
acc act act gaa gcc tct aag aag acc acc act act gaa gct tcc aag	336
Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys Lys Thr Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys	
75 80 85	
aag acc acc act act gaa gcc tct aag aag acc acc act act act aag	384
Lys Thr Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys Lys Thr Thr Thr Thr Thr Lys	
90 95 100 105	
aag gct tct acc tcc act tcc tct tcc tct tct tct gct tct aca aac	432
Lys Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Thr Asn	
110 115 120	
tac tcc gct gtc tct ggt ggt gcc tcc ggt aat ggt gaa acc act cgc	480
Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn Gly Glu Thr Thr Arg	
125 130 135	
tac tgg gat tgt tgt aag cct tct tgc agt tgg ccc ggt aag gct gat	528
Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asp	
140 145 150	
gtc acc tcc cct gtt ggc tcc tgt aac aag gat ggt aag act ctt gct	576
Val Thr Ser Pro Val Gly Ser Cys Asn Lys Asp Gly Lys Thr Leu Ala	
155 160 165	
gat aac aac act caa aac ggc tgt gtt ggt ggt agc agc tac acc tgt	624
Asp Asn Asn Thr Gln Asn Gly Cys Val Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Cys	
170 175 180 185	
aat gac aat caa cct tgg gtt gtt agc gac gac ctt gcc tac ggt ttc	672
Asn Asp Asn Gln Pro Trp Val Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Phe	
190 195 200	



gcc gct gct tcc att tct ggt ggt agc gaa gct act tgg tgt tgt gcc 720
 Ala Ala Ala Ser Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala Thr Trp Cys Cys Ala
 205 210 215
 tgt ttc gaa ctc aca ttc acc tct act gcc gtc aag ggt aag aag atg 768
 Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ala Val Lys Gly Lys Lys Met
 220 225 230
 gtt gtt caa gla acc aac act ggt tct gac ctt ggc tct aac act ggt 816
 Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Ser Asp Leu Gly Ser Asn Thr Gly
 235 240 245
 gct cac ttt gac ttg caa aig ccc ggt ggt ggt gtt ggt atc tac aat 864
 Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Tyr Asn
 250 255 260 265
 ggt tgt gcc act caa tgg ggt gct ccc acc gat ggt tgg ggt gca aga 912
 Gly Cys Ala Thr Gln Trp Gly Ala Pro Thr Asp Gly Trp Gly Ala Arg
 270 275 280
 tac ggc ggt gtt tct tct gcc tct gac tgt tct aac ctt cct tct gcc 960
 Tyr Gly Gly Val Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Asn Leu Pro Ser Ala
 285 290 295
 ctt caa gct ggt tgt aag tgg aga ttc ggc tgg ttc aaa aac gct gat 1008
 Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn Ala Asp
 300 305 310
 aac cca acc atg acc tac aaa caa gtt acc tgt ccc aag gct atc act 1056
 Asn Pro Thr Met Thr Tyr Lys Gln Val Thr Cys Pro Lys Ala Ile Thr
 315 320 325
 gcc aag tct ggc tgt tca aga aaa taa 1083
 Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg Lys
 330 335



<211> 338

<212> PRT

<213> Mucor circinelloides CP99001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-22)... (-1)

<221> mat_peptide

<222> (1)... (316)

<400> 7

Met Lys Phe Thr Val Ala Ile Thr Ser Ile Ala Val Ala Leu Ala Leu
-20 -15 -10
Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys
-5 1 5 10
Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr
15 20 25
Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly
30 35 40
Ser His Ser Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr Ser
45 50 55
Thr Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ala Lys Ala Thr Ala Thr Val Thr Thr
60 65 70
Lys Thr Val Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Ser Thr
75 80 85 90
Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Gly Tyr Lys Val
95 100 105
Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Trp Asp
110 115 120
Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr Gly



125 130 135
Pro Val Asp Thr Cys Ala Ser Asn Gly Ile Ser Leu Leu Asp Ala Asn
140 145 150
Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Gly Phe Met Cys Asn Asn Asn
155 160 165 170
Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala
175 180 185
Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu
190 195 200
Leu Thr Phe Thr Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Lys Met Val Val Gln
205 210 215
Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Gln
220 225 230
Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln Trp
235 240 245 250
Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser
255 260 265
Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys
270 275 280
Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr Phe
285 290 295
Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys Glu
300 305 310
Arg Lys
315

<210> 8

<211> 1017

<212> DNA



<213> Mucor circinelloides CP99001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)... (66)

<221> mat_peptide

<222> (67)... (1017)

<400> 8

atg aag ttc acc gtt gct att act tca atc gct gtt gca ctc gct ctc	48
Met Lys Phe Thr Val Ala Ile Thr Ser Ile Ala Val Ala Leu Ala Leu	
-20 -15 -10	
agc tct tct gct gaa gct gct tct tgc agc tct gtc tat ggt caa tgt	96
Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys	
-5 1 5 10	
ggt ggc att gga tgg agt gga cct acc tgt tgt gaa agt ggc tct act	144
Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr	
15 20 25	
tgc gtt gct caa gaa ggc aac aaa tac tac tct caa tgt ctt ccc gga	192
Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly	
30 35 40	
tcc cac agt aac aat gct ggt aac gct agc agc acc aag aag aca tct	240
Ser His Ser Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr Ser	
45 50 55	
acc aag aca tct act acc acc gcc aag gct act gct act gtc acc acc	288
Thr Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ala Lys Ala Thr Ala Thr Val Thr Thr	
60 65 70	
aag aca gta acc aag aca act acc aag aca act acc aag act agc act	336
Lys Thr Val Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Ser Thr	
75 80 85 90	



act gcc gct gct tct act tcc acc tct tct tct gct ggt tac aag gtc 384
 Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Gly Tyr Lys Val
 95 100 105
 atc tct ggc ggt aaa tct ggc agt ggt tcc aca act cgt tat tgg gat 432
 Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Trp Asp
 110 115 120
 tgt tgt aaa gct tct tgc agc tgg cct gga aaa gct tct gtc act ggt 480
 Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr Gly
 125 130 135
 cct gtt gac acc tgt gcc tcc aat ggt atc tct tta tta gat gcc aat 528
 Pro Val Asp Thr Cys Ala Ser Asn Gly Ile Ser Leu Leu Asp Ala Asn
 140 145 150
 gct caa agt ggt tgt aac ggt ggt aat ggt ttc atg tgt aac aac aac 576
 Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Gly Phe Met Cys Asn Asn Asn
 155 160 165 170
 caa cct tgg gct gtc aat gat gag ctc gct tac ggt ttc gct gct gcc 624
 Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala
 175 180 185
 tct att gct ggc tcc aac gaa gct gga tgg tgt tgt ggc tgt tat gaa 672
 Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Gly Cys Tyr Glu
 190 195 200
 ttg acc ttc act tct ggc gct gct tct gga aag aag atg gtt gtt caa 720
 Leu Thr Phe Thr Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 205 210 215
 gtt acc aac acc ggt ggc gat tta ggc tct aac cac ttt gat ttg caa 768
 Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Gln
 220 225 230
 atg ccc ggt ggt ggc gtt ggt atc ttc aat ggc tgt gct gct caa tgg 816
 Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln Trp



235 240 245 250
 ggc gct ccc aat gat ggc tgg gga gct aga tat ggt ggt gtc agc tct 864
 Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser Ser
 255 260 265
 gtc tct gac tgt gcc tct ctt ccc tct gct ctt caa gct ggt tgt aaa 912
 Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys
 270 275 280
 tgg aga ttc aac tgg ttc aag aac tct gat aac cct acc atg acc ttc 960
 Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr Phe
 285 290 295
 aag gaa gtt acc tgt cct gct gaa tta act act cgc tca ggt tgc gaa 1008
 Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys Glu
 300 305 310
 aga aag taa
 Arg Lys
 315
 1017

<210> 9

<211> 387

<212> PRT

<213> Mucor circinelloides CP99001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-22)... (-1)

<221> mat_peptide

<222> (1)... (365)

<400> 9

Met Lys Phe Thr Val Ala Ile Thr Ser Ile Ala Val Ala Leu Ala Leu

-20 -15 -10
 Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys
 -5 1 5 10
 Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Asp Ala Gly Ser Thr
 15 20 25
 Cys Lys Ala Gln Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Lys
 30 35 40
 Pro Lys Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Ser Ser Val Tyr Ser Gln
 45 50 55
 Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser
 60 65 70
 Thr Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro
 75 80 85 90
 Gly Ser His Ser Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr
 95 100 105
 Ser Thr Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ala Lys Ala Thr Ala Thr Val Thr
 110 115 120
 Thr Lys Thr Val Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Ser
 125 130 135
 Thr Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Gly Tyr Lys
 140 145 150
 Val Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Trp
 155 160 165 170
 Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr
 175 180 185
 Gly Pro Val Asp Thr Cys Ala Ser Asn Gly Ile Ser Leu Leu Asp Ala
 190 195 200
 Asn Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Gly Phe Met Cys Asn Asn
 205 210 215

Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala
220 225 230
Ala Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Gly Cys Tyr
235 240 245 250
Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Lys Met Val Val
255 260 265
Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu
270 275 280
Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln
285 290 295
Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser
300 305 310
Ser Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys
315 320 325 330
Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr
335 340 345
Phe Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys
350 355 360
Glu Arg Lys
365

<210> 10

<211> 1164

<212> DNA

<213> *Mucor circinelloides* CP99001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)... (66)

<221> mat_peptide

<222> (67)... (1164)

<400> 10

atg aag ttc acc gtt gct att act tca atc gct gtt gca ctc gct ctc	48
Met Lys Phe Thr Val Ala Ile Thr Ser Ile Ala Val Ala Leu Ala Leu	
-20 -15 -10	
agc tct tct gct gaa gct gct tct tgc agc tct gtc tat ggt caa tgt	96
Ser Ser Ser Ala Glu Ala Ala Ser Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys	
-5 1 5 10	
ggc ggc att ggc tgg act ggt cct aca tgt tgt gat gct gga tcg acc	144
Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Asp Ala Gly Ser Thr	
15 20 25	
tgt aaa gct caa aag gat aac aaa tat tat tct caa tgt att ccc aaa	192
Cys Lys Ala Gln Lys Asp Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Lys	
30 35 40	
ccc aag ggt tcc tcc tca tca tca tca tgt agt tcc gtc tat agt caa	240
Pro Lys Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Ser Ser Val Tyr Ser Gln	
45 50 55	
tgc ggt ggc att gga tgg agt gga cct acc tgt tgt gaa agt ggc tct	288
Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser	
60 65 70	
act tgc gtt gct caa gaa ggc aac aaa tac tac tct caa tgt ctt ccc	336
Thr Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro	
75 80 85 90	
gga tcc cac agt aac aat gct ggt aac gct agc agc acc aag aag aca	384
Gly Ser His Ser Asn Asn Ala Gly Asn Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr	
95 100 105	
tct acc aag aca tct act acc acc gcc aag gct act gct act gtc acc	432
Ser Thr Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ala Lys Ala Thr Ala Thr Val Thr	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

110	115	120	
acc aag aca gta acc aag aca act acc aag aca act acc aag act agc			480
Thr Lys Thr Val Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Lys Thr Ser			
125	130	135	
act act gcc gct gct tct act tcc acc tct tct tct gct ggt tac aag			528
Thr Thr Ala Ala Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Gly Tyr Lys			
140	145	150	
gtc atc tct ggc ggt aaa tct ggc agt ggt tcc aca act cgt tat tgg			576
Val Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Trp			
155	160	165	170
gat tgt tgt aaa gct tct tgc agc tgg cct gga aaa gct tct gtc act			624
Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Ser Val Thr			
175	180	185	
ggt cct gtt gac acc tgt gcc tcc aat ggt atc tct tta tta gat gcc			672
Gly Pro Val Asp Thr Cys Ala Ser Asn Gly Ile Ser Leu Leu Asp Ala			
190	195	200	
aat gct caa agt ggt tgt aac ggt ggt aat ggt ttc atg tgt aac aac			720
Asn Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Gly Phe Met Cys Asn Asn			
205	210	215	
aac caa cct tgg gct gtc aat gat gag ctc gct tac ggt ttc gct gct			768
Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Glu Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala			
220	225	230	
gcc tct att gct ggc tcc aac gaa gct gga tgg tgt tgt ggc tgt tat			816
Ala Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Gly Cys Tyr			
235	240	245	250
gaa ttg acc ttc act tct ggc gct gct tct gga aag aag atg gtt gtt			864
Glu Leu Thr Phe Thr Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Lys Met Val Val			
255	260	265	
caa gtt acc aac acc ggt ggc gat tta ggc tct aac cac ttt gat ttg			912

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu
 270 275 280
 caa atg ccc ggt ggt ggc gtt ggt atc ttc aat ggc tgt gct gct caa 960
 Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ala Ala Gln
 285 290 295
 tgg ggc gct ccc aat gat ggc tgg gga gct aga tat ggt ggt gtc agc 1008
 Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ala Arg Tyr Gly Gly Val Ser
 300 305 310
 tct gtc tct gac tgt gcc tct ctt ccc tct gct ctt caa gct ggt tgt 1056
 Ser Val Ser Asp Cys Ala Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys
 315 320 325 330
 aaa tgg aga ttc aac tgg ttc aag aac tct gat aac cct acc atg acc 1104
 Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ser Asp Asn Pro Thr Met Thr
 335 340 345
 ttc aag gaa gtt acc tgt cct gct gaa tta act act cgc tca ggt tgc 1152
 Phe Lys Glu Val Thr Cys Pro Ala Glu Leu Thr Thr Arg Ser Gly Cys
 350 355 360
 gaa aga aag taa 1164
 Glu Arg Lys
 365

<210> 11

<211> 346

<212> PRT

<213> Phycomyces nitens CP99002

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-19)... (-1)

<221> mat_peptide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<222> (1)... (327)

<400> 11

Met Lys Phe Ser Ile Ile Ala Ser Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser
 -15 -10 -5
 Thr Tyr Ala Ala Glu Cys Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys
 1 5 10
 Met Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Thr Ser Gly Phe Thr Cys Val Gly
 15 20 25
 Ala Glu Asn Asn Glu Trp Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Asn Asp Gln Val
 30 35 40 45
 Gln Gly Asn Pro Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Lys Ala Ala Thr
 50 55 60
 Thr Thr Lys Ala Pro Val Thr Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Thr Thr
 65 70 75
 Thr Lys Ala Pro Val Thr Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 80 85 90
 Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr Lys Ala Ala Thr Thr Thr Ser
 95 100 105
 Ser Ser Asn Thr Gly Tyr Ser Pro Ile Ser Gly Gly Phe Ser Gly Asn
 110 115 120 125
 Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp
 130 135 140
 Asp Gly Lys Ala Ser Val Thr Lys Pro Val Leu Thr Cys Ala Lys Asp
 145 150 155
 Gly Val Ser Arg Leu Gly Ser Asp Val Gln Ser Gly Cys Val Gly Gly
 160 165 170
 Gln Ala Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Val Val Asn Asp Asp
 175 180 185

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Ala Gly Ala Ser
190 195 200 205
Ala Phe Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Asn Thr Ala Val
210 215 220
Ala Gly Lys Lys Phe Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Asp Asp Leu
225 230 235
Ser Thr Asn His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Tyr
240 245 250
Phe Asn Gly Cys Gln Ser Gln Trp Asn Thr Asn Thr Asp Gly Trp Gly
255 260 265
Ala Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ile Ser Glu Cys Asp Lys Leu Pro
270 275 280 285
Thr Gln Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn
290 295 300
Ala Asp Asn Pro Glu Val Thr Phe Lys Ala Val Thr Cys Pro Ala Glu
305 310 315
Ile Ile Ala Lys Thr Gly Cys Glu Arg Lys
320 325

<210> 12

<211> 1041

<212> DNA

<213> *Phycomyces nitens* CP99002

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)... (57)

<221> mat_peptide

<222> (58)... (1041)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 12

atg aag ttc tcc atc atc gct tcc gcc ctt ctc ctc gct gcc agc tcc	48
Met Lys Phe Ser Ile Ile Ala Ser Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser	
-15 -10 -5	
act tac gct gct gaa tgc agc caa ggc tat ggc cag tgt ggt ggc aag	96
Thr Tyr Ala Ala Glu Cys Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys	
1 5 10	
atg tgg act ggt ccc acc tgc tgc acc tcc gcc ttc acc tgt gta ggt	144
Met Trp Thr Gly Pro Thr Cys Cys Thr Ser Gly Phe Thr Cys Val Gly	
15 20 25	
gcc gaa aac aac gag tgg tac tct cag tgt atc ccc aac gat caa gtc	192
Ala Glu Asn Asn Glu Trp Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Asn Asp Gln Val	
30 35 40 45	
cag ggt aac ccc aag acc acc acc acc acc acc acc aag gct gcc act	240
Gln Gly Asn Pro Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Lys Ala Ala Thr	
50 55 60	
acc acc aag gct cct gtc acc acc acc aag gcc acc acc acc acc acc	288
Thr Thr Lys Ala Pro Val Thr Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Thr Thr	
65 70 75	
acc aag gcc cct gtc acc acc acc aag gcc act act act acc acc acc	336
Thr Lys Ala Pro Val Thr Thr Thr Lys Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr	
80 85 90	
aag acc acc acc aag acc acc acc acc aag gct gcc acc acc acc tcc	384
Lys Thr Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr Lys Ala Ala Thr Thr Thr Ser	
95 100 105	
tct tcc aac act ggc tac agc ccc att tct ggt ggc ttc tct gga aac	432
Ser Ser Asn Thr Gly Tyr Ser Pro Ile Ser Gly Gly Phe Ser Gly Asn	
110 115 120 125	
ggc cgc act acc cgc tac tgg gat tgc tgc aag ccc tct tgc gcc tgg	480

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ala Trp
 130 135 140
 gac gga aag gct tct gta act aag cct gta ctc acc tgt gcc aag gat 528
 Asp Gly Lys Ala Ser Val Thr Lys Pro Val Leu Thr Cys Ala Lys Asp
 145 150 155
 ggt gtc agc cgt ctc ggt tcc gat gtc cag agc ggt tgc gtc ggc ggc 576
 Gly Val Ser Arg Leu Gly Ser Asp Val Gln Ser Gly Cys Val Gly Gly
 160 165 170
 cag gcc tac atg tgc aat gac aac cag ccc tgg gtt gtc aat gac gac 624
 Gln Ala Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Val Val Asn Asp Asp
 175 180 185
 ctt gcc tac ggt ttc gct gct gcc agt ctc ggt agc gcc ggt gcc tct 672
 Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Ala Gly Ala Ser
 190 195 200 205
 gca ttc tgc tgc ggc tgt tac gag ctt acc ttc acc aac act gct gtc 720
 Ala Phe Cys Cys Gly Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr Asn Thr Ala Val
 210 215 220
 gct ggc aag aag ttt gtc gtc cag gtc acc aac acc ggt gat gat ctc 768
 Ala Gly Lys Lys Phe Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Asp Asp Leu
 225 230 235
 agc acc aac cac ttt gat ttg cag atg ccc ggc ggt ggt gtc ggc tac 816
 Ser Thr Asn His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Tyr
 240 245 250
 ttc aac ggc tgc cag tcc cag tgg aac acc aac acc gat ggc tgg ggt 864
 Phe Asn Gly Cys Gln Ser Gln Trp Asn Thr Asn Thr Asp Gly Trp Gly
 255 260 265
 gct cgc tat ggc ggt att agc tct att tca gag tgc gac aag ctt cct 912
 Ala Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ile Ser Glu Cys Asp Lys Leu Pro
 270 275 280 285

THIS PAGE BLANK (USPTO)

acc cag ttg cag gct ggt tgc aag tgg aga ttc gga tgg ttc aag aac 960
 Thr Gln Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn
 290 295 300
 gct gac aac cca gag gtc acc ttc aag gct gtt act tgc cct gcc gag 1008
 Ala Asp Asn Pro Glu Val Thr Phe Lys Ala Val Thr Cys Pro Ala Glu
 305 310 315
 atc att gcc aag act ggt tgc gag cgc aag taa 1041
 Ile Ile Ala Lys Thr Gly Cys Glu Arg Lys
 320 325

<210> 13

<211> 1043

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> sig_peptide

<222> (16)... (84)

<221> mat_peptide

<222> (84)... (1043)

<400> 13

ggatcctggg acaag atg aag ttc atc act atc gcc tcc tcc gcc ctc ctt 51
 Met Lys Phe Ile Thr Ile Ala Ser Ser Ala Leu Leu

-20

-15

gcc ctc gcc ctt ggc act gag atg gcc tcc gcc gct gag tgc tcc aag 99
 Ala Leu Ala Leu Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Glu Cys Ser Lys

-10

-5

1

5

ctc tac gga cag tgc ggc gga aag aac tgg aac ggc ccc acc tgc tgc 147
 Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

	10	15	20	
	gag agc ggc tgc acc tgc aag gtc tgc aat gac tac tac agc cag tgc			195
	Glu Ser Gly Ser Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys			
	25	30	35	
	ctg ccg agc ggc tcc tgc gga aac aag tgc agc gag tgc gcc cac aag			243
	Leu Pro Ser Gly Ser Ser Gly Asn Lys Ser Ser Glu Ser Ala His Lys			
	40	45	50	
	aag acc acg acc gct gcc cac aag aag acc acg acc gcc gct cac aag			291
	Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys			
	55	60	65	
	aag act acg acc gct ccc gcc aag aag acc acg acc gtc gcc aag gct			339
	Lys Thr Thr Thr Ala Pro Ala Lys Lys Thr Thr Thr Val Ala Lys Ala			
	70	75	80	85
	tcg act ccg tcc aac tgc agc agc tgc tct tgc gga aag tac agc gct			387
	Ser Thr Pro Ser Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ala			
	90	95	100	
	gtc agc ggt ggc gct agc ggc aac ggc gtc act acc cgc tac tgg gac			435
	Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp			
	105	110	115	
	tgc tgc aag gct tgc tgc tgc tgg ccc ggc aag gct aac gtc agc tgc			483
	Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser			
	120	125	130	
	cct gtc aag tcc tgc aac aag gac ggc gtc acc gct ctt agc gac tcc			531
	Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser			
	135	140	145	
	aac gcc cag tcc ggc tgc aac ggc ggc aac tcc tac atg tgc aac gac			579
	Asn Ala Gln Ser Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp			
	150	155	160	165
	aac cag cca tgg gct gtc aac gac aac ctt gct tac ggt ttc gct gcc			627

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala
 170 175 180
 gct gcc att agc ggc ggt ggc gag agc cgc tgg tgc tgc tcc tgc ttc 675
 Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe
 185 190 195
 gag ctc acc ttc acc tcc acc agc gtt gct ggc aag aag atg gtc gtc 723
 Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val
 200 205 210
 cag gtc acc aac act ggc ggt gac ctt ggc agc tcg acc ggt gcc cac 771
 Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His
 215 220 225
 ttc gat ctc cag atg ccc ggc ggc ggc gtc ggc atc ttc aac gga tgc 819
 Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys
 230 235 240 245
 tcg tcc cag tgg ggc gct ccc aac gac ggc tgg ggc tcg cgc tac ggc 867
 Ser Ser Gln Trp Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly
 250 255 260
 ggc atc agc tcc gcc agc gac tgc tcg tcc ctc ccc agc gcc ctc cag 915
 Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln
 265 270 275
 gcc ggc tgc aag tgg cgc ttc aac tgg ttc aag aac gcc gac aac ccg 963
 Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro
 280 285 290
 tcc atg acc tac aag gag gtc acc tgc ccc aag gag atc acc gct aag 1011
 Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys
 295 300 305
 acc gga tgc tcg cgc aag taa acgcagg atcc 1043
 Thr Gly Cys Ser Arg Lys
 310 315

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 14

<211> 40

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 14

Ala	Glu	Cys	Ser	Lys	Leu	Tyr	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Lys	Asn	Trp	Asn
1				5				10				15			
Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Thr	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Asp
			20					25				30			
Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu	Pro	Ser								
			35				40								

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> *Mucor circinelloides* CP99001

<400> 15

Ala	Ser	Cys	Ser	Ser	Val	Tyr	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile	Gly	Trp	Ser
1				5				10				15			
Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Glu										
					20										

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> *Phycomyces nitens* CP99002

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 16

Ala Glu Cys Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Met Trp Thr
1 5 10 15
Gly Pro Thr Cys Cys Thr Ser
20

<210> 17

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence

<400> 17

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Cys Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn
20 25 30
Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Cys Xaa
35

<210> 18

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (CBD)

<400> 18

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Cys Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Asn
20 25 30
Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Cys Xaa
35

<210> 19

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (CBD)

<400> 19

Cys Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Cys Gly Gly Xaa Xaa Trp Xaa Gly Pro
1 5 10 15
Thr Cys Cys Xaa Xaa Gly Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa
20 25 30
Xaa Tyr Ser Gln Cys Xaa
35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 20

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (CBD)

<400> 20

Cys Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Cys Gly Gly Xaa Xaa Trp Xaa Gly Pro
1 5 10 15

Thr Cys Cys Xaa Xaa Gly Xaa Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa
20 25 30

Xaa Tyr Ser Gln Cys Xaa
35

<210> 21

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (CBD)

<400> 21

Cys Ser Lys Xaa Tyr Xaa Gln Cys Gly Gly Lys Xaa Trp Xaa Gly Pro
1 5 10 15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa

20

25

30

Xaa Tyr Ser Gln Cys Xaa

35

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<400> 22

Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn Gly Pro

1

5

10

15

Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr

20

25

30

Ser Gln Cys Leu

35

<210> 23

<211> 36

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<400> 23

Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro

1

5

10

15

Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr

20

25

30

Ser Gln Cys Leu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

35

<210> 24

<211> 38

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<400> 24

Cys Ser Lys Ala Tyr Tyr Gln Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asp Gly Pro

1

5

10

15

Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr Cys Val Asp Tyr Pro Asp Asn Pro

20

25

30

Phe Tyr Ser Gln Cys Val

35

<210> 25

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (CBD)

<400> 25

Cys Ser Ser Val Tyr Xaa Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Xaa Gly Pro

1

5

10

15

Thr Cys Cys Xaa Xaa Gly Ser Thr Cys Xaa Ala Gln Xaa Xaa Asn Lys

20

25

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tyr Tyr Ser Gln Cys Xaa

35

<210> 26

<211> 38

<212> PRT

<213> *Mucor circinelloides* CP99001

<400> 26

Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Pro

1 5 10 15

Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr Cys Val Ala Gln Glu Gly Asn Lys

20 25 30

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu

35

<210> 27

<211> 38

<212> PRT

<213> *Mucor circinelloides* CP99001

<400> 27

Cys Ser Ser Val Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro

1 5 10 15

Thr Cys Cys Asp Ala Gly Ser Thr Cys Lys Ala Gln Lys Asp Asn Lys

20 25 30

Tyr Tyr Ser Gln Cys Ile

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 28

<211> 38

<212> PRT

<213> *Phycomyces nitens* CP99002

<400> 28

Cys	Ser	Gln	Gly	Tyr	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Lys	Met	Trp	Thr	Gly	Pro
1				5				10						15	
Thr	Cys	Cys	Thr	Ser	Gly	Phe	Thr	Cys	Val	Gly	Ala	Glu	Asn	Asn	Glu
			20					25					30		
Trp	Tyr	Ser	Gln	Cys	Ile										
			35												

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (linker)

<400> 29

Xaa	Thr	Arg	Tyr	Xaa	Asp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (linker)

<400> 30

Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Gly Gly Xaa Ser Gly
1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (linker)

<400> 31

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Gly Xaa Xaa Gly
1 5 10

<210> 32

<211> 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence (linker)

<400> 32

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Gly Xaa Xaa Gly
1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<400> 33

Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly
1 5 10

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<400> 34

Tyr Ser Ile Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly
1 5 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> *Mucor circinelloides* CP99001

<400> 35

Tyr Lys Val Ile Ser Gly Gly Lys Ser Gly
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> *Phycomyces nitens* CP99002

<400> 36

Tyr Ser Pro Ile Ser Gly Gly Phe Ser Gly
1 5 10

<210> 37

<211> 26

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 37

Ala Lys Ala Ser Thr Pro Ser Asn Ser Ser Ser Ser Ser Gly Lys
1 5 10 15
Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly
20 25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 38

Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 39

Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly

1 5 10

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 40

Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys

1 5 10 15

Lys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<400> 41

Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala

1

5

10

15

Leu Gln

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<400> 42

Arg Phe Asn Trp Phe Lys

1

5

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 43

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aaraaytgga ayggncnac

20

<210> 44

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 44

ttraaccart traancg

17

<210> 45

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 45

ttraaccart traayct

17

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 46

caatgtcttc cctctggaag cag

23

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 47

tgcccttagt gacagcaatg ccc

23

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 48

cttccttccg cactccaagc tgg

23

<210> 49

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 49

ccagcttggga gtgcggaagg aag

23

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 50

tcactaaggg cagtgacacc atc

23

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 51

cagagggaag acattgagag tag

23

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 52

acaacattat ttcttcaaac atg

23

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 53

aaatgccgca tcaagtttta ttg

23

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 54

ttcacttcta cctctgttgc tgg

23

<210> 55

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 55

gtaataaact tcatagatct atgtaaaaag aatg

34

<210> 56

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 56

ggatgagtal aaaagatctt atttcttga ac

32

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 57

cacattcaga agctttattg ccac

24

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 58

gagctagagc cagagttaga ag

22

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 59

gagaactgac atcgcccta cc

22

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 60

acaacattat ttcttcgaat atg

23

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 61

tttagcagca gaggccattt cag

23

<210> 62

<211> 23

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 62

ttttctatcc tgatacagag atg

23

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 63

gcgcctcataa aacgactact acc

23

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 64

tgcccttagt gacagcaatg tcc

23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 65

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 65

caagaaaata agatcttita tactcctact

30

<210> 66

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 66

aacggcaata aggcctctga atgtagc

27

<210> 67

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 67

gaaagcaatg gccagaaaac ttctgaaag

29

<210> 68

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 68

gcttcaaact ctctagactc tagcggc

27

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 69

cggtaaggcc gacgtcagtt ctcc

24

<210> 70

<211> 23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 70

tacaggagcc aacaggggag gtg

23

<210> 71

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 71

ttcacagcag gtaggtccat tcc

23

<210> 72

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 72

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cctacggttt cgccgctgct tcc

23

<210> 73

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 73

tagataccaa caccaccacc ggg

23

<210> 74

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 74

tgaagttcct taccattgcc tcc

23

<210> 75

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 75

tggtgaaacc actcgctact ggg

23

<210> 76

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 76

ttctgcctct gactgttcta acc

23

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 77

aatagagtta ctctatacga tag

23

<210> 78

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 78

caccaccaga gacagcggag tag

23

<210> 79

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 79

lgcgttgatt atcctgacaa tcc

23

<210> 80

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 80

gcggatccat gaagttcctt accattgcc

29

<210> 81

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 81

gcggatcctt attttcttga acagccaga

29

<210> 82

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 82

gtggaggatga gatcttcatt gggaac

26

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 83

cagcggagta cttttagtaa gcag

24

<210> 84

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 84

gggagatcctt gggacaagat gaagtttatt actattg

37

<210> 85

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 85

ggatcaacaa gtctgtgcgg atcctgggac aagatggcca agttcttccct tac

53

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 86

<211> 132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 86

gggggatacct gggacaagat gaagttcatc actatcgccct cctccgccct ccttgccctc 60
gcccttggca ctgagatggc ctcgcccgt gagtgcacca agctctacgg ccagtgcggc 120
ggaaagaact gg 132

<210> 87

<211> 136

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 87

ggccgacitcg ctgcacttgt ttcccagga gccgctcggc aggcactggc tglagtagtc 60
attcgagacc ttgcaggitcg agccgctctc gcagcaggitg gggccgttcc agttctttcc 120
gccgcactgg ccglag 136

<210> 88

<211> 150

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 88

gggctcgagt tggacggagt cgaagccttg gcgacggtcg tggctctctt ggcgggagcg 60
gtcgtagtct tcttgtagc ggcggtcgtg gtcttcttgt gggcagcggc cgtggctctc 120
ttgtgggccg actcgctcga cttgtttccc 150

<210> 89

<211> 158

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 89

ggaaacaagt cgagcgagtc ggcccacaag aagaccacga ccgctgcca caagaagacc 60
acgaccgccg ctcaacaaga gactacgacc gtcccccca agaagaccac gaccgtcgcc 120
aaggcttcga ctccgtccaa ctcgagcagc tcgtcttc 158

<210> 90

<211> 160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 90

gtccttgttg caggacttga caggcgagct gacgttagcc ttgccggggcc acgagcacga 60
agccttgcag cagtcccagt agcgggtagt gacgccgttg ccgctagcgc caccgctgac 120
agcgctgtac ttccccgagg acgagctgct cgagttggac 160

<210> 91

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 91

agcccatggc tggttgtcgt tgcacatgta ggagttgccg ccgttgcagc cggactgggc 60
gttggagtcg ctaagagcgg tgacgccgic ctltgttcag gacttgacag gcgagctgac 120

<210> 92

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 92

ggtgagctcg aagcaggagc agcaccagcg gctctcgcca ccgccgctaa tggcagcggc 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

agcgaaaccg taagcaaggt tgcgttgac agcccatggc tggttgtcgt tgcacatg 118

<210> 93

<211> 154

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 93

gtgcccactt cgaatccag atgcccggcg gcggcgtcgg catcttcaac ggatgtcgt 60
cccagtgagg cgctcccaac gacggctggg gctcgctca cggcggcatc agctccgcca 120
gcgactgtc gtccctccc agcgccctcc aggc 154

<210> 94

<211> 154

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 94

ggggggatcc tgcgtttact tgcgcgagca tccggctta gcggtagatc ccttggggca 60
ggtagacctc ttgtaggta tggacgggtt gtcggcgttc ttgaaccagt tgaagcgcca 120
cttgcagccg gccctggagg cgctggggag ggac 154

<210> 95

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 95

ggggagctca ccttcacctc caccagcggt gctggcaaga agatggtcgt ccaggtcacc 60
aacactggcg gtgaccttgg cagctcgacc ggtgccact tcatctcca gatgcc 117

<210> 96

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 96

ggggggatcc tgcgtttact tgcgcgagca tc

32

<210> 97

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 97

tcagcggtagg cgctagcggc aac

23

<210> 98

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 98

ctaatggcag cggcagcgaa acc

23

<210> 99

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 99

ccggtagcca cttagatctc cag

23

<210> 100

<211> 23

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 100

tccttccgcc gcactgtccg tag

23

<210> 101

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 101

acgacaacca gccatgggct gtc

23

<210> 102

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 102

tcctcgaatga ctactacagc cag

23

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 103

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 103

cccactggga cgagcatccg ttg

23

<210> 104

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 104

cgagctgctc gagttggacg gag

23

<210> 105

<211> 16

<212> PRT

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<400> 105

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ala Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn
1 5 10 15

<210> 106

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 106

gactgaccgg tgttcatcc

19

<210> 107

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 107

ctcggttgtc atagatgtgg

20

<210> 108

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 108

cccacagaag ggatccatga tggtcgc

27

<210> 109

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 109

gcgaattcat gaagttcacc gtlgctatt

29

<210> 110

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 110

gcgaattctt actttcttgc gcaacctg

28

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 111

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 111

cttgggtgctg ccagcgttac cag

23

<210> 112

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 112

gcggatccat gaagttctcc atcatcg

27

<210> 113

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 113

gcggatcctt acttgcgcic gcaacca

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05884

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N 9/42, C12N 15/56, C11D 3/386, D06M 16/00, D21H 11/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N 9/42, C12N 15/56, C11D 3/386, D06M 16/00, D21H 11/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO, 96/29397, A1 (NOVO-NORDISK AS), 26 September, 1996 (26.09.96) & EP, 815209, A1 & JP, 11-502701, A	1, 2, 60, 62 3-59, 61, 63
A	Saloheimo Anu et al., "A novel, small endoglucanase gene, eg15, from Trichoderma reesei isolated by expression in yeast", Molecular Microbiology (1994), Vol. 13, No. 2, pages 219-228	1-85
A	WO, 97/43409, A2 (NOVO-NORDISK AS), 20 November, 1997 (20.11.97) & EP, 898618, A2	1-85
A	WO, 98/12307, A1 (NOVO-NORDISK AS), 26 March, 1998 (26.03.98) & EP, 937138, A1	1-85

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 11 January, 2000 (11.01.00)

Date of mailing of the international search report

18.01.00

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05884

B x I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims relating to enzymes are classified into the following groups of inventions:
claims 1 to 9 (60-85);
claims 10 to 28 (60 to 85);
claims 29 to 36 (60 to 85);
claims 37 to 39 (60 to 85); and
claims 40 to 59 (60 to 85).

Enzymes relating to these groups of inventions have no feature in common but having "endoglucanase activity" and there have been well known enzymes having the endoglucanase activity. Therefore, it does not appear that there is a technical relationship among these groups of inventions involving a special technical feature.

Such being the case, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark n Protest ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/05884

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C 1 2 N 9/42, C 1 2 N 15/56, C 1 1 D 3/386, D 0 6 M 16/00, D 2 1 H 11/20

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C 1 2 N 9/42, C 1 2 N 15/56, C 1 1 D 3/386, D 0 6 M 16/00, D 2 1 H 11/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Swiss Prot/PIR/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO, 96/29397, A1 (NOVO-NORDISK AS) 26.9月. 1996 (26.09.96) & EP, 815209, A1 & JP, 11-502701, A	1, 2, 60, 62 /3-59, 61, 63
A	Saloheimo Anu et al., "A novel, small endoglucanase gene, eg15, from Trichoderma reesei isolated by expression in yeast", Molecular Microbiology (1994), Vol.13, No.2, p.219-228	1-85
A	WO, 97/43409, A2 (NOVO-NORDISK AS) 20.11月. 1997 (20.11.97) & EP, 898618, A2	1-85

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.01.00

国際調査報告の発送日

18.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4 N 9 1 6 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/12307, A1 (NOVO-NORDISK AS) 26. 3月. 1998 (26. 03. 98) & EP, 937138, A1	1 - 8 5

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

酵素に関する請求項は次の発明群に分けられる。

- ・請求項 1-9 (60-85)
- ・請求項 10-28 (60-85)
- ・請求項 29-36 (60-85)
- ・請求項 37-39 (60-85)
- ・請求項 40-59 (60-85)

各発明群に係る酵素は「エンドグルカナーゼ活性」を有すること以外に共通する特徴を有していない。そして、エンドグルカナーゼ活性を有する酵素は周知であるので、各発明群に係る酵素が、特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるとは認められない。よって、各発明群は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)